

FP1085-PCT Spec (1)

## NOVEL, RECOMBINANTLY PRODUCED SPIDER SILK ANALOGS

Publication number: JP8511426T Inventor: ~~Stephen Fahnestock~~ FAHNESTOCK, Stephen,  
R. [US/US]: 719 Mt. Lebanon Road, Wilmington, DE  
19803-1609 (US).  
Publication date: 1996-12-03  
Inventor: Applicant (Small Business): E.I. DU PONT  
Applicant: DE NEMOURS AND COMPANY [US/US]: 1007 Market  
Classification: Street, Wilmington, DE 19898 (US).  
- International: C07K14/435; C12N1/15; C12N1/21; C12N15/12; F02B75/02;  
C07K14/435; C12N1/15; C12N1/21; C12N15/12; F02B75/02;  
(IPC1-7): C12N15/09; C07H21/04; C07K14/435; C12N1/11;  
C12N1/21; C12N1/11; C12R1/125; C12N1/21; C12R1/19  
- european: C07K14/435A2  
Application number: JP19940502174T 19940615  
Priority number(s): WO1994US06689 19940615; US19930077600 19930615

Also published as:

WO9429450 (A3)  
WO9429450 (A2)  
EP0707645 (A3)  
EP0707645 (A2)  
EP0707645 (A0)

more &gt;&gt;

Report a data error here

Abstract not available for JP8511426T

Abstract of corresponding document: WO9429450

The invention relates to novel spider silk protein analogs derived from the amino acid consensus sequence of repeating units found in the natural spider dragline of *Nephila clavipes*. More specifically, synthetic spider dragline has been produced from *E. coli* and *Bacillus subtilis* recombinant expression systems wherein expression from *E. coli* is at levels greater than 1 mg full-length polypeptide per gram of cell mass.

```
1      ...      CG A GAAAAA-CG
2  A GCG GYG GLG CCG - - - - -
3  A GCG GYG GLG CCG A - - - - - GCG A GAAAAAAGG
4  A GCG GYG GLG CCG A GCG - - - GCG A GAAAAA-CG
5  A GCG GYG GLG CCG A GCG GLG CCG A GAAAAAAGG
6  A GCG GYG GLG CCG A GCG - - - CCG - - - AAAAAAGG
7  A GCG GYG GLG CCG A GCG GLG CCG A GAAAAA-CG
8  A GCG GYG GLG CCG - - - - -
9  A GCG GYG GLG CCG A GCG GLG CCG A GAAAAAAGG
10 A GCG - - - GLG CCG A - - - - - GCG A GAAAAA-CG
11 A GCG GYG GLG CCG A GCG - - - GCG A GAAAAA-CG
12 A GCG GYG GLG CCG - - - - -
13 A GCG GYG GLG CCG A GCG GLG CCG A GAAAAA-CG
14 A GCG - - - GLG CCG A - - - - - GCG A GAAAAA-CG
15 A GCG GYG GLG CCG A GCG GLG CCG A GAAAAAAGG
16 A GCG GYG GLG CCG A GCG - - - GCG A GAAAAA-CG
17 A GCG GYG GLG CCG A GCG GLG CCG A GAAAAAAGG
18 A GCG GYG GLG CCG A GCG - - - CCG - - - AAAAA-CG
19 A GCG GYG GLG CCG A GCG - - - GCG A GAAAAA-VG
20 A GCG - - - GCG CCG - - - - -
21 A GCG GYG GLG CCG A GCG GLG CCG A GAAAAA-CG
22 A GCG - - - GLG CCG A - - - - - GCG A GAAAAA-CG
23 V RCG GYG GLG CCG A GCG - - - CCG A GAAAAA-CG
24 A GCG GYG GLG CCG V GCG GLG CCG A GAAAAA-CG
25 A GCG GYG CVC S - - - - - -G A SAASAAAA--
```

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-511426

(43) 公表日 平成8年(1996)12月3日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 H 21/04		8615-4C	C 0 7 H 21/04 B
C 0 7 K 14/435		8517-4H	C 0 7 K 14/435
C 1 2 N 1/11		8828-4B	C 1 2 N 1/11
1/21		8828-4B	1/21

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全185頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-502174  
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)6月15日  
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)12月12日  
(86) 国際出願番号 PCT/US94/06689  
(87) 国際公開番号 WO94/29450  
(87) 国際公開日 平成6年(1994)12月22日  
(31) 優先権主張番号 08/077, 600  
(32) 優先日 1993年6月15日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71) 出願人 イー・アイ・デュボン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー  
アメリカ合衆国デラウェア州19898ウイルミントン・マーケットストリート1007  
(72) 発明者 フアーネストック, スチーブン・アール  
アメリカ合衆国デラウェア州19803-1609  
ウイルミントン・マウントレバノンロード719  
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規の組換え産生性クモシルクアナログ

(57) 【要約】

本発明は、ネフィラ クラビペス (*Nephila clavipes*) の天然のクモしおり糸に見いだされるアミノ酸共通配列の反復性単位から取得される新規のクモシルク蛋白質アナログに関する。より具体的には、合成クモしおり糸は、大腸菌 (*E. coli*) からの発現が細胞量のグラム当たり1mgを上回るレベルの全長ポリペプチドである、大腸菌 (*E. coli*) およびバチルス スプテリス (*Bacillus subtilis*) 組換え発現系から産生される。

FIG.1

```
1      ...      OG A GAAAAA--GG
2  A GQG GYG GLG GQG --- -- -- --
3  A GQG GYG GLG GQG A --- -- -- GQG A GAAAAAAGG
4  A GQG GYG GLG SQG A GRG --- GQG A GAAAAA--GG
5  A GQG GYG GLG SQG A GRG GLG GQG A GAAAAAAGG
6  A GQG GYG GLG NQG A GRG --- GQG ---AAAAAGG
7  A GQG GYG GLG SQG A GRG GLG GQG A GAAAAA--GG
8  A GQG GYG GLG GQG --- -- -- --
9  A GQG GYG GLG SQG A GRG GLG GQG A GAAAAAAGG
10 A GQG --- GLG GQG A --- -- -- GQG A GAAAAA--GG
11 A GQG GYG GLG SQG A GRG --- GQG A GAAAAA--GG
12 A GQG GYG GLG GQG --- -- -- --
13 A GQG GYG GLG SQG A GRG GLG GQG A GAAAAA--GG
14 A GQG --- GLG GQG A --- -- -- GQG A GAAAAA--GG
15 A GQG GYG GLG SQG A GRG GLG GQG A GAAAAAAGG
16 A GQG GYG GLG SQG A GRG --- GQG A GAAAAA--GG
17 A GQG GYG GLG NQG A GRG GLG GQG A GAAAAAAGG
18 A GQG GYG GLG NQG A GRG --- GQG ---AAAA--GG
19 A GQG GYG GLG SQG A GRG --- GQG A GAAAAA--VG
20 A GQG --- GYG GQG --- -- -- --
21 A GQG GYG GLG SQG S GRG GLG GQG A GAAAAA--GG
22 A GQG --- GLG GQG A --- -- -- GQG A GAAAAA--GG
23 V RQG GYG GLG SQG A GRG --- GQG A GAAAAA--GG
24 A GQG GYG GLG GQG V GRG GLG GQG A GAAAAA--GG
25 A GQG GYG GYG S--- -- -- -- --G A SAAAAA--
```

## 【特許請求の範囲】

1. (i) クモしおり糸蛋白質の線維形成性領域から取得される共通配列の変異体からなるポリペプチド単量体をコードする約50bpと1000bpとの間のDNA単量体配列を設計する段階、

(ii) 前記DNA単量体を組み立てる段階、

(iii) 前記DNA単量体を重合して全長シルク変異体蛋白質をコードする合成遺伝子を形成する(ただし前記合成遺伝子はネフィラ クラビペス (*Nephila clavipes*) ゲノムのいずれかの部分もコードしない) 段階、

(iv) 適切な宿主細胞を前記合成遺伝子を含むベクターで形質転換する段階、

(v) 前記合成遺伝子を発現させ、そのことにより前記遺伝子によりコードされる蛋白質を細胞質量の1グラム当たり1mgと300mgとの間の全長蛋白質のレベルで産生する段階、

(vi) 有用な形態で前記蛋白質を回収する段階、  
を含む方法により産生される新規の合成クモしおり糸変異体蛋白質。

## 2. 核酸配列、

```

GGGCCGGTCG AGGTGGACAA GGTGCAGGTG CAGCCGCTGC TGCTGCGGGC GCGCAGGTC 60
AAGGTGGGTA TGGGGGTTTA GGTTCACAAG GGGCCGGACG TGGTGGCCTT GGTGGTCAGG 120
GTGCTGGCGC GGCAGCCGCT GCGGCAGCTG GTGGTGCTGG TCAGGGCGGT CTGGGCTCAC 180
AAGGGGCCGG TCAAGGCGCT GGTGCAGCAG CAGCTGCCGC TGGCGGTGCA GGCCAAGGTG 240
GATATGGTGG CTTAGGGTCA CAAGGGGCCG GGCAAGGTGG TTACGGCGGT CTCGGATCAC 300
AAG 303

```

[この配列中、配列番号80と表示される前記配列はDP-1A、9のアミノ酸単量体をコードする]

から本質的になる組成物。

3. 重合される場合にはDP-1A、9のアミノ酸単量体の1~16回縦列反復物を含むクモシルク変異体蛋白質をコードする核酸配列を本質的になる組成物。

4. 請求の範囲2の核酸配列の1～16回縦列反復物からなる組成物。

5. 核酸配列、

```
GGGCCGGGCA AGGTGGTTAC GGCGGTCTCG GATCACAAGG GGCCGGACGT GGTGGCCTTG 60
GTGGTCAGGG TGCTGGCGCG GCAGCCGCTG CGGCAGCTGG TGGTGCTGGT CAGGGCGGTC 120
TTGGCTCACA AGGGGCCGGT CAAGGCGCTG GTGCAGCAGC AGCTGCCGCT GGCGGTGCAG 180
GCCAAGGTGG ATATGGTGGC TTAGGGTCAC AAGGGGCCGG TCGAGGTGGA CAAGGTGCAG 240
GTGCAGCCGC TGCTGCTGCG GGCGGCGCAG GTCAAGGTGG GTATGGGGGT TTAGGTTTAC 300
AAG 303
```

[この配列中、配列番号81と表示される前記配列はDP-1B、9のアミノ酸単量体をコードする]

から本質的になる組成物。

6. 重合される場合にはDP-1B、9のアミノ酸単量体の1～16回縦列反復物を含むクモシルク変異体蛋白質をコードする核酸配列から本質的になる組成物。

7. 請求の範囲5の核酸配列の1～16回縦列反復物からなる組成物。

8. 核酸配列、

```
TCTCAGGGTG CTGGCCAGGG TGGCTATGGT GGCCTGGGAT CTCAAGGCGC TGGTCGCGGT 60
GGCCTGGGTG GCCAGGGTGC AGGTGCTGCT GCTGCTGCGG CTGCTGGTGG TGCAGGTCAG 120
GGTGGTCTGG GATCTCAGGG CGCAGGTCAA GGTGCTGGTG CAGCTGCGGC GGCAGCTGGT 180

GGCGCGGGTC AAGGTGGCTA CGGCGGTTTA GGATCTCAAG GTGCGGGTCG CGGTGGTCAG 240
GGCGCTGGTG CAGCAGCGGC AGCAGCAGGT GGCCTGGGCC AAGGTGGTTA CGGTGGTCTT 300
GGA 303
```

[この配列中、配列番号82と表示される前記配列はDP-1B、16のアミノ酸単量体をコードする]

から本質的になる組成物。

9. 重合される場合にはDP-1B、16のアミノ酸単量体の1～16回縦列反復物を含むクモシルク変異体蛋白質をコードする核酸配列から本質的になる組成物。

10. 請求の範囲8の核酸配列の1～16回縦列反復物からなる組成物。

11. 核酸配列、

```

GGGCCATCCG GCCCAGGTTC TGC GGCAGCG GCAGCAGCGG GCCCAGGGCA GCAGGGGCCG 60
GGCGGTACG GTCCGGGTCA GCAAGGCCCA GGTGGCTACG GCCCAGGCCA ACAGGGGCCA 120
TCTGGTCCGG GTAGCGCTGC GGCTGCTGCT GCTGCGGCAG GTCCAGGCGG CTACGGGCCG 180
GGCCAACAAG GTCCGGGCGG CTA TGGTCCA GGTCAACAGG GGCCGAGCGG TCCAGGTTCC 240
GCAGCAGCAG CGGCTGCGGC GGCAGCGGGT CCAGGTGGTT ACGGGCCAGG CCAGCAGGGT 300
CCGGGTGGCT ATGGCCAGG CCAGCAAGGT CCGGGTGGTT ACGGTCCAGG TCAGCAG 357

```

【この配列中、配列番号83と表示される前記配列はDP-2Aのアミノ酸単量体をコードする】

から本質的になる組成物。

12. 重合される場合にはDP-2Aのアミノ酸単量体の1~16回縦列反復物を含むクモシルク変異体蛋白質をコードする核酸配列から本質的になる組成物。

13. 請求の範囲11の核酸配列の1~16回縦列反復物からなる組成物。

成物。

14. 適切なプロモーターに操作可能かつ発現可能なように連結された請求の範囲3、6、9、もしくは12の組成物を含み、そして細胞質量のグラム当たり1mgと300mとの間の全長蛋白質のレベルでのクモシルク変異体蛋白質の発現のために宿主細胞を形質転換することが可能であるプラスミド。

15. 前記組成物が、5'端もしくは3'端のいずれかで4と20との間一連のヒスチジン残基をコードするDNA断片により両脇を挟まれている、請求の範囲14に記載のプラスミド。

16. 細胞質量のグラム当たり1mgと300mとの間の全長蛋白質のレベルでクモシルク変異体蛋白質を発現することが可能な、請求の範囲14もしくは15のプラスミドを含む、形質転換された宿主細胞。

17. 前記宿主細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、バチルス スブチリス (*Bacillus subtilis*)、ピキア パストリス (*Piccia pastoris*)、アスペルギルス エスピー (*Aspergillus sp.*)、およびストレプトミセス エスピー (*Streptomyces sp.*) からなる群より選択される、請求の範囲16に記載の宿主細胞。

18. 前記宿主細胞が細胞増殖培地内にクモシルク変異体蛋白質を分泌することが可能な、請求の範囲3、8、9、もしくは12の組成物を含むプラスミドで形質転換される宿主細胞。

19. ATCC番号ATCC 69328により同定される、形質転換化大腸菌 (*E. coli*) 宿主FP3350。

20. ATCC番号ATCC 69327により同定される、形質転

換化バチルス スプチリス (*Bacillus subtilis*) 宿主FP2193。

21. クモシルク変異体蛋白質の発現に有用であり、いずれかのクモシルク変異体DNAを欠いており、かつATCC番号ATCC 69326により同定される細菌宿主内に含まれる万能発現ベクターpFP204。

22. (i) クモしおり糸蛋白質の線維形成性領域から取得される共通配列の変異体からなるポリペプチド単量体をコードする約50bpと1000bpとの間のDNA単量体配列を設計する段階、

(ii) 前記DNA単量体を組み立てる段階、

(iii) 前記DNA単量体を重合して全長シルク変異体蛋白質をコードする合成遺伝子を形成する段階、

(iv) 適切な宿主細胞を前記合成遺伝子を含むベクターで形質転換する段階、

(v) 前記合成遺伝子を発現させ、そのことにより前記遺伝子によりコードされる蛋白質が細胞質量のグラム当たり1mgと300mgとの間の全長蛋白質のレベルで産生される段階、

(vi) 有用な形態で前記蛋白質を回収する段階、

を含む、合成クモしおり糸変異体蛋白質の産生のための方法。

23. (i) クモしおり糸蛋白質の線維形成性領域から取得される共通配列の変異体からなるポリペプチド単量体をコードする約50bpと1000bpとの間のDNA単量体配列を設計する段階、

(ii) 前記DNA単量体を組み立てる段階、

(iii) 前記DNA単量体を重合して全長シルク変異体蛋白

質をコードする合成遺伝子を形成する段階、

(iv) 適切な宿主細胞を前記合成遺伝子を含むベクターで形質転換する段階、

(v) 前記合成遺伝子を発現させ、そのことにより前記遺伝子によりコードされる蛋白質が細胞外培地中に分泌される段階、

(vi) 有用な形態で前記蛋白質を回収する段階、  
を含む、合成クモしおり糸変異体蛋白質の産生のための方法。

24. 前記全長変異体蛋白質が、式

$[ACQGGYGGLGXQGAGRGG LGGQGAGAnGG]z$

[式中、X=S、G、もしくはNであり、 $n=7$ 、および $z=1\sim75$ である]  
により特定され、かつ

(a)  $n=0$ である場合には、AGRGG LGGQGAGAnGGを含む配列が欠損し、

(b) ポリアラニン以外の欠損は3つの連なる残基の整数倍部分を含むであろうし、

(c) GYGの欠損は同一反復物内のGRGの欠損を伴い、そして

(d) 完全なポリアラニン配列を欠く反復物の前に6つのアラニン残基を含む反復物が存在する、かつ

全長蛋白質が、ネフィラ クラビペス (*Nephila clavipes*) ゲノムのいずれかの部分によってもコードされない、請求の範囲1に記載のクモしおり糸変異体蛋白質。

25. 前記全長シルク変異体蛋白質が、式

$[GPGGYGPGQQGP GGYGPGQQGP GGYGPGQQ$

$GPSGPGSAn]z$

[式中、 $n=6\sim10$ 、および $z=1\sim75$ である]

により特定され、かつポリアラニン配列を除外すると、個々の反復物は、ペンタ

ペプチド配列GPGGYもしくはGPGQの内の一つもしくは両方からなる5つの連なる残基の整数倍部分の欠損により共通反復配列とは異なり、かつこの全長蛋白質が、ネフィラ クラビペス (Nephila clavipes) ゲノムのいずれかの部分によってもコードされない、請求の範囲1に記載のクモしおり糸変異体蛋白質。



## 【発明の詳細な説明】

## 新規の組換え産生性クモシルクアナログ

## 発明の分野

本発明は、ネフィラ クラビペス ( Nephila clavipes ) の天然のクモしおり糸に見いだされるアミノ酸共通配列の反復単位から取得される新規のクモシルク蛋白質アナログに関する。より具体的には合成クモしおり糸が、大腸菌 ( E. coli ) からの発現が細胞質量のグラム当たり 1mg の全長ポリペプチドを上回るレベルである大腸菌 ( E. coli ) およびバチルス スブチリス ( Bacillus subtilis ) 組換え発現系から産生される。

## 背景

強度および耐久性を損なうことなく軽量かつしなやかさの両方を兼ね備える材料および布についての需要は常に増加しているため、耐屈曲性、デニール、引張強さ、およびモジュールのような特性についての高い許容度を保持する新規の線維の必要性が生じた。より良い線維についての調査は天然に産生される線維の調査へと至り、それらの内の幾つかのものは注目すべき特性を有している。ボムビックス モリ ( Bombyx mori ) (カイコ) により産生される天然シルクの長所は長年にわたりよく知られているが、他の天然に産生されるシルクが調査されたのはつい最近のことに過ぎない。

クモシルクが数々の所望される特性を有することが示されている。円網の巣をかける (orb-weaving) クモは6本の異

なる種類の腺組織からシルクを産生することができる。6本の線維の各々は異なる機械的特性を有する。しかしながらこれら全ては数々の共通の特性を有する。それらは、(i) ほとんどもしくは全て蛋白質でできおり、(ii) 実質的に不可逆的である可溶性形態から不溶性形態への移行を受け、(iii) アラニン、セリン、およびグリシンにより大半が占められるアミノ酸でできており、かつグルタミン、チロシン、ロイシン、およびバリンのような他のアミノ酸の相当な量を有する、ということである。クモしおり糸シルク線維は粘着性無定型セグメン

トが散在する逆平行 $\beta$ -シート構造の偽結晶性領域からなることが提唱されている。

クモシルクは、鋼鉄よりも強い引張強さ（7.8対3.4G/デニール）を示すものおよび羊毛よりも強い耐屈曲性を有するものからKEVLAR（商標）よりも大きなエネルギー対ブレイク限界（ $1 \times 10^5$ 対 $3 \times 10^4$ JKG $^{-1}$ ）を特徴とする他のものまでの範囲にわたる。これらの特徴が付与されるとすると、クモシルクを様々な織物用適用のための軽量高強度線維として使用することができる。

天然のクモシルクを可溶化および精製することを試みたところ、線維の分子量の一貫性は保持されるもののかなりの難題に遭遇した。シルク線維は例えばLiSCN、LiClO<sub>4</sub>、もしくは88%（vol/vol）のギ酸のような非常に苛酷な試薬以外では不溶性である。いったん溶解しても、透析する場合、もしくは典型的な緩衝液で希釈する場合にその蛋白質は沈殿する。クモシルク蛋白質の他の欠点は、養殖クモからは少量のみが取得可能であり、このことが商業的に有用な量のシルク蛋白質を適度なコストで入手することを不可能なものにしてしまっている。

その上、クモシルクの複数の形態がいずれかの所定のクモにより同時に産生される。得られる混合物は単一の単離シルクよりも適応性が低く、それは様々なクモシルク蛋白質がまちまちの特性を有し、かつ溶解性の問題のためにそれらの物理的特性に基づく方法によってはそれらを容易に分離することができないためである。それゆえ、天然の源から商業的な量のクモシルクを産生することの見込みは実用的なものとはならず、そして別の様式の産生方法の必要性が残されている。組換え遺伝子の技術が、このような様式の一つを提供する。

組換えDNA技術の使用により、現在では商業的に有用な量での所望される蛋白質の発現の目的のために異なる生物体間でDNAを転移させることが可能である。このような転移は通常、DNAの適切な断片をベクター分子に接続させ、それをその後に形質転換によりレシピエント生物体内に取り込ませることを必要とする。形質転換体をベクター上の既知のマーカーによるか、あるいは遺伝子的も

しくは生化学的スクリーニングにより選択してクローン化断片を同定する。ベクターは、宿主細胞内で自律的な複製を可能にするか、あるいは宿主内の染色体内への組込みを可能にする配列を含む。

クローン化DNA配列がある蛋白質をコードする場合には、宿主細胞内の活性化形態でのこの外来性蛋白質の合成を獲得するための一連の現象が生じる必要がある。プロモーター配列が存在してRNAポリメラーゼによるこの遺伝子の転写を可能にする必要があり、そしてリボソームによる翻訳のためには転写されたmRNA中にリボソーム結合部位および開始コドンが存在する必要がある。これらの転写のおよび翻訳的認識配列は、通常宿主RNAポリメラーゼおよびリボソームによる効果的な

結合のために至適化されており、そしてベクターの賢明な選択によって宿主細胞内の多数の外来性遺伝子の効率のよい発現を獲得することが可能であることがしばしばである。

効率のよい転写および翻訳の問題の多くが一般的に認識されており、そして大部分のものについてはそれらの問題が克服されているものの、多数の反復単位を含む線維形成性の外来性ポリペプチドの合成は独特な問題を投げかけている。この種の蛋白質をコードする遺伝子は、反復性核酸配列に起因して遺伝子的に不安定である傾向がある。理想的には、これらは少なくとも800アミノ酸残基からなり、かつ一般的には限定されたアミノ酸組成を有する高分子量の蛋白質をコードする。大腸菌 (*E. coli*) は1000残基を上回る内因性蛋白質を産生するものの、限定されたアミノ酸組成の長い蛋白質の産生は生物合成系内に不安定な株を導入して、恐らくは不完全な翻訳に起因すると思われる切断された産物の産生をもたらすものと思われる。既述の難点にも拘わらず、線維形成性蛋白質の組換え発現が当該技術分野で知られている。Chatellardら、Gene, 81, 267, (1989) は、大腸菌 (*E. coli*) からのヒトアデノウイルスのタイプ2の三量体線維蛋白質のクローニングおよび発現を教示している。外来性蛋白質が総宿主蛋白質の1%のレベルに達するバクテリオファージT7のRNAポリメラーゼおよび至適遺伝子発現を頼みにする遺伝子発現系が3

0℃下で取得されている。

Goldbergら、Gene、80、305 (1989) は、コラーゲンア  
ナログ (ポリ (Gly-Pro)) をコードする合成遺伝子の大腸菌 (E. coli)  
でのクローニングおよび発現を開示

している。最大DNA挿入断片は450塩基対の概寸であり、そして大きなセグ  
メントの高反復性DNAは大腸菌 (E. coli) 内では不安定となる可能性  
があることが示唆された。

Ferrari (国際公開第8803533号) は、合成構造遺伝子の発現  
による、例えばシルク様蛋白質およびエラスチン様蛋白質に見いだされるもの  
のような反復性オリゴマー単位を有するポリペプチドの産生のための方法および組  
成物を開示している。FerrariのDNA配列は、少なくとも3つの異なる  
アミノ酸および総計4~30のアミノ酸を含むオリゴペプチド反復単位を含むペ  
プチドをコードするが、ただしそのペプチド内には少なくとも2つの反復単位が  
存在し、かつ各反復単位内に少なくとも2つの相同なアミノ酸が存在する。

Cappello (国際公開第9005177号) は、整列した鎖へと組み  
立てることが可能な反復単位の鎖を含む形質転換原核生物宿主からの蛋白質性重  
合体の産生、および同重合体をコードするDNA配列を教示している。この反復  
単位は、例えばフィブロイン、エラスチン、ケラチン、もしくはコラーゲンのよ  
うな天然のポリマーから取得される。

シルク様蛋白質のクローニングおよび発現も知られている。Ohshimaら  
、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、74、5363 (1  
997) は、大腸菌 (E. coli) 内への、ボムビックス モリ (Bombyx mori) の  
フランク配列を完備するシルクフィブロイン遺伝子のクロー  
ニングを報告している。petty-Saphon (欧州特許第230702  
号) は、大腸菌 (E. coli)、サッカロミセス セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae)、  
プセウドモナス エスピー (Pseudomonas)

omonas sp)、ロドシュウドモナス エスピー ( Rhodopseudomonas sp)、バキルス エスピー ( Bacillus sp)、およびストレプトミセス エスピー ( Streptomyces sp) を初めとする種々の宿主からのシルクフィブロインおよびシルクセリシンの組換え産生を開示している。好ましい態様においてはボムビックス モリ ( Bombyx mori) から取得されるシルク蛋白質の発現が検討されている。

クモシルク蛋白質のクローニングおよび発現においては進歩がもたらされてもいる。Xuら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、87, 7120 (1990) は、部分的cDNAクローンに基づく、クモのネフィラクラビペス ( Nephila clavipes ) からのしおり系シルク蛋白質スピドロイン 1 (Spidroin 1) の反復配列の一部分のための配列の決定を報告している。この反復単位は最大34アミノ酸長であり、そして厳密には保存されない。この反復単位は2つの異なるセグメント、つまり (i) 5~7残基のポリアラニン配列により大半が占められる10アミノ酸セグメント、(ii) 配列内で保存されるが、ただし多くの反復単位中に複数回の3アミノ酸の欠損を有する24アミノ酸セグメント、からなる。後者の配列は主にGlyXaaGlyモチーフからなり、Xaaはアラニン、チロシン、ロイシン、もしくはグルタミンである。このDNAについてのコドン使用はかなり選択的であり、第三位におけるシトシンもしくはグアニンの使用が回避されている。

HinmanおよびLewis、J. Biol. Chem. 267, 19320 (1992) は、ネフィラ クラビペス ( Nephila

clavipes ) のしおり系シルクからの第二フィブロイン蛋白質であるスピドロイン 2 (Spidroin 2) の反復配列の一部分をコードする部分的cDNAクローンの配列を報告している。スピドロイン 2の反復単位は最大51アミノ酸長であり、そしてやはり厳密には保存されない。スピドロイン2のcDNAのコドン利用の頻度はスピドロイン 1に非常に類似している。

Lewisら (欧州特許第452925号) は、形質転換化大腸菌 ( E. coli ) からの、蛋白質断片および変異体を初めとするネフィラ クラビペス (

Nephila clavipes ) のクモシルク蛋白質の発現を開示している。2つの固有の蛋白質が独立に同定およびクローン化され、そしてシルク蛋白質 1 (スピドロイン 1) およびシルク蛋白質 2 (スピドロイン 2) として識別された。

Lombardi ら (国際公開第 9 1 1 6 3 5 1 号) は無定型のドメインもしくはサブユニット、ならびに結晶性のドメインもしくはサブユニットを含む組換えクモシルク蛋白質の産生を教示しており、この場合これらのドメインもしくはサブユニットは独特な機械的構造的特性を提供する反復性アミノ酸配列を含む蛋白質の一部を意味する。

既述の発現系は組換えシルクおよびシルク変異体の産生には有用であるが、しかしそれら全てはシルク産生性生物体の特異的クローン化遺伝子を頼みにしている。このような系の一つの有害な効果は、コドン使用が組換え宿主内の外来性蛋白質の産生のために至適化される訳ではないことである。外来性遺伝子の発現は、発現が所望される生物体により好まれないコドンが回避される場合に一層効率的であることが当該技術分野においてよく知られている。組換え宿主内にクローン化される外来性

遺伝子は、宿主内では典型的に見いだされることのないコドン使用を頼みとすることがしばしばである。このことが外来性蛋白質の粗悪な収率をもたらすことがよくある。

従って、商業的に有用な量でクモシルク蛋白質を産生するための方法についての必要性が残されている。1%~30%の総宿主蛋白質という商業的に有用な量で合成蛋白質を産生する能力を有する外来性宿主内で発現されることが可能なクモシルク蛋白質から取得される共通配列の変異体をコードする新規の DNA 配列を提供することによりこのような必要性を満たすことが、本発明の目的である。

#### 発明の要旨

本発明は、クモしおり系蛋白質の線維形成性領域から取得される共通配列の変異体からなるポリペプチド単量体をコードする約 50bp と 1000bp との間の DNA 単量体配列を設計する段階、その DNA 単量体を組み合わせる段階、そ

のDNA単量体を重合して全長シルク変異体蛋白質をコードする合成遺伝子を形成する段階、その合成遺伝子を含むベクターで適切な宿主細胞を形質転換する段階、そのDNA重合体によりコードされる蛋白質が細胞質量のグラム当たり1mgを上回る全長蛋白質のレベルで産生されるようにそのDNA重合体を発現させる段階、および有用な形態でその蛋白質を回収する段階を含む方法により産生される新規の合成クモシオリ糸変異体蛋白質を提供する。

本発明は、クモシルク変異体蛋白質をコードするDNA組成物を含む新規のプラスミド、および細胞質量当たり1mgを上回る全長ポリペプチドのレベルでそのシルク変異体蛋白質を発現することが可能なこれらのプラスミドを含む新規の形質転換化宿主細胞を提供する。

本発明の範囲内には、細胞増殖培地中に全長のクモシオリ糸蛋白質アナログを分泌することが可能な形質転換化宿主細胞も含まれる。

好ましい態様では、人工遺伝子はネフィラ クラビペス ( Nephila clavipes ) のしおり糸線維の蛋白質の内の一つであるクモシルク蛋白質のアナログをコードするように構築される。このような人工遺伝子を天然の蛋白質とおおよそ同じ長さの蛋白質をコードするように組み立ておよび重合することが可能な手段が提供される。その上、このような人工遺伝子を細菌宿主内で調節化様式で発現させて、大量のその蛋白質産物を産生することが可能な手段が提供される。この蛋白質産物は線維へと形成するのに適する精製形態で調製することができる。本発明の主題はクモシルク変異体蛋白質であるものの、本発明を他の高反復性線維形成性蛋白質もしくはこのような天然の蛋白質の変異体を含むように拡張することが可能であることが理解されるべきである。本発明は、組換えDNA技術を用いる微生物中での商業的に有用な量のクモシルク蛋白質の産生のための方法を提供する。このような蛋白質の産生の微生物的方法は数々の利点を提供するであろう。例えば微生物源は、商業的適用法のための十分に低いコストでの大量の線維形成性蛋白質の産生のための基盤を提供するであろう。微生物宿主は、このような線維の利用性を拡張することが可能と思われる線維形成性蛋白質の変異体形態ならびに新規の蛋白質の構築および産生のための組換えDNA技術

の適応を可能にするであろう。その上微生物的産生は、検査のための変異体蛋白質の試料の迅速調製を可能にするであろう。このような蛋白質は、天然の線維中に見いだされる他の蛋白質を含まず、個々の蛋白質の特性を個別に研究することを可能にするであろう。

#### 図面の簡単な記述、配列表、および生物学的寄託物

図1は、Xuら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、87、7120(1990)により開示される天然のクモしおり糸蛋白質スピドロイン 1のアミノ酸配列(配列番号19)を説明する。

図2は、クモシルクDP-1A、9アナログ(配列番号80)の単量体(配列番号20)および重合体(配列番号21)についてのアミノ酸配列を説明する。

図3は、クモシルクDP-1B、9(配列番号81)の単量体(配列番号22)および重合体(配列番号23)についてのアミノ酸配列を説明する。

図4は、DP-1蛋白質発現のためのDNA単量体の構築に用いられる合成オリゴヌクレオチド、L(配列番号24~26)、M1(配列番号27~29)、M2(配列番号30~32)、およびS(配列番号33~35)を説明する。

図5は、pA126iからのプラスミドpFP510の構築を説明するプラスミドマップである。プラスミドpFP510を用いてDNA単量体およびDP-1Aアナログをコードする遺伝子の組み立ておよび重合のためのプラスミドが構築される。

図6は、高レベル発現ベクターを構築するのに用いられるプラスミドpFP202のプラスミドマップである。

図7は、DP-2蛋白質発現のためのDNA単量体の構築に用いられる6本の二本鎖合成オリゴヌクレオチド、A(配列番号41~43)、B(配列番号44~46)、C(配列番号47~49)、D(配列番号50~52)、E(配列番号53~55)、およびF(配列番号56~

58)を説明する。

図8は、Lewisら(欧州特許第452925号)により記載される天然の



クモシルク蛋白質スピドロイン 2 のアミノ酸配列 (配列番号 59) を説明する

。

図 9 は、クモしおり糸蛋白質 2 アナログである DP-2A (配列番号 83) のアミノ酸単量体 (配列番号 60) および重合体 (配列番号 61) のアミノ酸配列を説明する。

図 10 は、クモしおり糸蛋白質 1 アナログである DP-1B. 16 (配列番号 82) のアミノ酸単量体 (配列番号 62) および重合体 (配列番号 63) のアミノ酸配列を説明する。

図 11 は、DP-1B. 16 (配列番号 82) をコードする合成遺伝子を構築するのに用いられる 4 本の二本鎖合成オリゴヌクレオチド、1 (配列番号 64~66)、2 (配列番号 67~69)、3 (配列番号 70~72)、および 4 (配列番号 73~75) を説明する。

図 12 は、pA126i からのプラスミド pFP206 の構築を説明するプラスミドマップである。プラスミド pFP206 を用いて DNA 単量体および DP-1B アナログをコードする遺伝子の組み立ておよび重合のために用いられるプラスミドを構築した。

図 13 は、プラスミド pA126i の全核酸配列 (配列番号 78) を説明する

。

図 14 は、pBE346 の全 DNA 配列 (配列番号 79) を説明する。

図 15 は、DP-1A アナログ蛋白質発現および分泌のために B. subtilis (B. subtilis) 細胞を形質転換するのに用いられたプラスミド pFP191 の構築を説明するプラスミドマップである。

○

図 16 は、DP-1B. 33 をコードする合成遺伝子を構築するのに用いられる 4 本の合成二本鎖オリゴヌクレオチド、P1、P2、P3、および P4 を説明する。P1 は配列番号 84、85、および 86 に相当する。P2 は配列番号 87、88、および 89 に相当する。P3 は配列番号 90、91、および 92 に相当する。P4 は配列番号 93、94、および 95 に相当する。

図 17 は、ピキア パストリス ( Pichia pastoris ) 内の細胞

内蛋白質発現のためのベクターを構築するのに用いられるプラスミドpHIL-D4のプラスミドマップである。

図18は、*P. pastoris* ( *P. pastoris* ) 内の細胞外蛋白質産生のためのベクターを構築するのに用いられるプラスミドpPIC9のプラスミドマップである。

図19は、*P. pastoris* ( *P. pastoris* ) 内の細胞外蛋白質産生のためのベクターの構築の際の中間体であるプラスミドpFO734の一部のDNA配列を説明する。

図20は、*P. pastoris* ( *P. pastoris* ) 株YFP5028によるDP-1B産生を説明する。

図21は、*P. pastoris* ( *P. pastoris* ) 株YFP5093によるDP-1B産生を説明する。

出願者は、「特許出願におけるヌクレオチドおよびアミノ酸配列の標準的表示のための規定」(OJ EPO 12/1992への補足事項第2項目に公開されるEPOの代表の決定事項への付属書類IおよびII)に従う配列表1~107を提供する。

出願者は、ブダペスト条約の規定に従って以下の生物学的寄託を行っ

た。

<u>寄託もしくは確認用参照番号</u>	<u>ATCC表示</u>	<u>寄託日</u>
大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> )、FP 3227	69326	1993年6月15日
大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> )、FP 2193	69327	1993年6月15日
大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> )、FP 3350	69328	1993年6月15日

本明細書で用いられる際には、表示「ATCC」は、12301 Parklawn Drive、Rockville、MD 20852、U. S. A. のRockville、Marylandに存在するAmerican Type Culture Collection受託機関を意味する。

#### 発明の詳細な記述

以下の定義が本明細書では用いられ、そしてそれらは請求の範囲および明細書

の解釈のために引用されるべきである。

本明細書に用いられる際には用語「プロモーター」および「プロモーター領域」は、RNAポリメラーゼおよび／または転写を正しい位置で開始させるのに必要な他の因子についての認識を提供することによりコーディング領域の発現を調節し、通常は構造遺伝子の蛋白質コーディング配列の上流（5'側）に位置するDNAの配列を意味する。プロモーター配列は遺伝子の発現を稼働させるのに必要であるが、常に十分という訳ではない。

「断片」は、特別な領域のDNA配列の一分画を構成する。

「核酸」は、糖、リン酸エステル、およびプリンもしくはピリミジンの内のいずれかを含む単量体（ヌクレオチド）でできている一本鎖もしくは二本鎖であることが可能な分子を意味する。細菌、下等真核生物お

よび高等動物、ならびに植物では、「デオキシリボ核酸」（DNA）が遺伝的物質を意味する一方で、「リボ核酸」（RNA）は、DNAから蛋白質への情報の翻訳に関わる。

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「蛋白質」は互換可能に用いられる。

「調節」および「調節する」は、ある遺伝子の転写開始の上流（5'側）に本来位置するDNA配列要素により調節される遺伝子発現の調節を意味するが、このような調節は限定的ではない。調節は、ある刺激に対して全か無かの応答をもたらす可能性があるか、あるいは遺伝子発現のレベルの変異値をもたらす可能性がある。

用語「コーディング配列」は、ある蛋白質、ポリペプチド、もしくはそれらの一部分をコードし、かつ転写の開始を稼働させる調節配列を除外する遺伝子の部分を意味する。コーディング配列は中断されないコーディング領域を構成する可能性があるか、あるいはその配列は適切なスプライシング部位により連結される一つもしくは複数のイントロンを含む可能性がある。コーディング配列は異なる源、すなわち天然もしくは合成のものから取得されるセグメントの複合物である可能性がある。

用語「構築」もしくは「構築する」は、あるプロモーター断片および適切な 3' 非翻訳配列を伴う選択される遺伝子産物のための DNA 配列の、ある細胞内への組込みが可能である非反復構築物内に多数のヌクレオチド配列を連結させてあるか、あるいは組み換えてある、いずれかの源から取得される直線状もしくは環状の一本鎖もしくは二本鎖の DNA もしくは RNA であるプラスミド、ウイルス、自律的複製性配列、ファージ、もしくはヌクレオチド配列を意味する。

本明細書で用いられる際には「形質転換」は、核酸の取り込みによる細胞内の新規の遺伝子の獲得である。

用語「操作的に連結される」は、機能的 RNA の転写を誘導するための、適切な向きでの 2 本の DNA 断片および読み取り枠の化学的融合を意味する。

本明細書に用いられる際には用語「発現」は、遺伝子産物の配列をコードする遺伝子からの遺伝子産物への転写および翻訳を意味することが意図される。発現の際には、遺伝子産物の配列をコードする DNA 鎖が最初に、メッセンジャー RNA であることがよくある相補的 RNA に転写され、そしてその後にも同様に転写されたメッセンジャー RNA は、その遺伝子産物が蛋白質である場合には既述の遺伝子産物へと翻訳される。

用語「翻訳開始シグナル」は、蛋白質合成の開始を特定する核酸内の 3 つのヌクレオチド単位 (コドン) を意味する。

用語「シグナルペプチド」は、分泌される成熟蛋白質の前につながるアミノ末端ポリペプチドを意味する。シグナルペプチドは成熟蛋白質から開裂され、そしてそのためこれは成熟蛋白質には存在しない。シグナルペプチドは、分泌される蛋白質を指令し、そしてその蛋白質に細胞膜を横切って転移させる機能を有する。シグナルペプチドはシグナル配列としても引用される。

用語「成熟蛋白質」は、接続するシグナルペプチドのいずれかの部分をも伴わない最終分泌化蛋白質産物を意味する。

本明細書に用いられる際には用語「プラスミド」もしくは「ベクター」は、細胞の中心的代謝の部分ではなく、かつ通常は環状二本鎖 DNA 分

子の形態をとる遺伝子をしばしば保持する染色体外要素を意味する。

用語「制限エンドヌクレアーゼ」は、二本鎖DNA中の特異的ヌクレオチド配列内での加水分解的開裂の触媒作用を行う酵素を意味する。

用語「適合性制限部位」は、開裂させた時にいずれかの追加的改変を伴わずに連結することが可能なヌクレオチド末端を生じる様々な制限部位を意味する。

用語「適切なプロモーター」は、合成クモシルク変異体遺伝子の発現を稼働させることが可能ないずれかの真核生物もしくは原核生物プロモーターを意味するであろう。

用語「クモシルク変異体蛋白質」は、そのアミノ酸配列が既知の天然クモシルク内に見いだされる反復配列モチーフおよびその変異体に基づく、設計された蛋白質を意味するであろう。

用語「全長変異体蛋白質」は、DNA単量体の組み立ておよび重合により構築される合成遺伝子によりコードされるいずれかのクモシルク変異体蛋白質を意味するであろう。

用語「DNA単量体」は、クモシルク変異体蛋白質の一つもしくは複数の反復アミノ酸配列をコードする300bpと400bpとの間からなるDNA断片を意味するであろう。本発明に適するDNA単量体の例が図2、3、9、および10に説明される。

用語「ペプチド単量体」、「ポリペプチド単量体」、もしくは「アミノ酸単量体」は、DNA単量体によりコードされるアミノ酸配列を意味するであろう。

用語「商業的な量」は、微生物性培養物により産生される総蛋白質の少なくとも1%が所望される蛋白質である、組み換え的に産生される所

望の蛋白質の量を意味する。

用語「所望される蛋白質」は、遺伝子工学的に処理された細菌から取得される有価産物とみなされるいずれかの蛋白質を意味するであろう。

用語「DP-1アナログ」は、図1に説明される、ネフィラ カルビペス (*Nephila calvipes*) の天然の蛋白質1 (スピドロイン 1 (Spidroin 1)) のアミノ酸配列から取得されるいずれかのクモシルク変異

体を意味するであろう。

用語「DP-2アナログ」は、図8に説明される、ネフィラ カルビペス ( N e p h i l a c a l v i p e s ) の天然の蛋白質2 (スピドロイン 2 (S p i d r o i n 2) ) のアミノ酸配列から取得されるいずれかのクモシルク変異体を意味するであろう。

本明細書に使用される際には以下の略語が特異的アミノ酸を同定するのに用いられるであろう。

<u>アミノ酸</u>	<u>3文字略語</u>	<u>一文字略語</u>
アラニン	A l a	A
アルギニン	A r g	R
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
アスパラギンもしくはアスパラギン酸	A s x	B
システイン	C y s	C
グルタミン	G l n	Q
グルタミン酸	G l u	E
グルタミンもしくはグルタミン酸	G l x	Z
グリシン	G l y	G

ヒスチジン	H i s	H
ロイシン	L e u	L
リシン	L y s	K
メチオニン	M e t	M
フェニルアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
セリン	S e r	S
スレオニン	T h r	T
トリプトファン	T r p	W
チロシン	T y r	Y
バリン	V a l	V

本発明は、組換え宿主内での商業的量のシルク蛋白質の発現に適するクモシルク蛋白質変異体をコードする新規のDNA配列も提供する。

このような蛋白質およびこのような方法の利点が多いことは評価されるであろう。クモシルク、特にしおり糸シルクは200ksiを越える引張強さを有し、ほぼ35%の耐屈曲性を伴い、このことがKEVLARもしくは鋼鉄のいずれかと比較して破壊することを一層難しくしている。線維に紡績する際には、本発明のクモシルクは全ての被服製造業者で評価を受け、そしてロープ、外科手術用縫合糸、所定の電氣的構成成分用の可変性のタイダウン (tie downs) のような所定の種類の高強度使用のため、ならびに移植術 (例えば、人工靱体もしくは大動脈用包帯) 用の生物材料としてさえ適用可能である可能性がある。追加的に、これらの線維を様々なプラスチックおよび/または樹脂と混合して線維補強化プラスチックおよび/または樹脂産物を調製することがで

きる。その上、クモシルクは最高100℃まで安定であるため、これらの線維を使用して熱注入化プラスチックを補強することができる。これらの蛋白質はフィルムもしくはコーティングの形態でも価値がある可能性がある。ある当業者には、シルク線維の特性を、その蛋白質のアミノ酸配列を変化させることにより変化

させることができることが評価されるであろう。

本発明は、組換えDNA技術を用いる天然のクモシルク蛋白質のアナログおよび変異体の産生のための方法を提供する。この方法は、(1)天然の蛋白質の線維形成性領域のアミノ酸配列に基づくアナログ蛋白質配列の設計、(2)最小内部反復性を有する少なくとも50bpのDNA単量体を基にし、かつ特異的宿主生物体の嗜好性に適合させたコドンの好ましい使用を行わせる、このようなアナログ蛋白質配列をコードするDNA配列の設計、(3)クローン化合成オリゴヌクレオチドからのDNA単量体の組み立て、(4)少なくとも800bp、そして好ましくは天然の蛋白質をコードする遺伝子の長さに近似する長さまでのDNA単量体の重合、(5)重合された人工遺伝子を、宿主生物体内で複製することが可能な適切なベクター内に、その遺伝子をその発現を調節することが可能な発現シグナルに操作的に連結させるという様式で挿入すること、(6)このような発現ベクターを保持する既述の微生物中でその産物を産生させること、(7)生物集団からその蛋白質を精製し、そしてそれを線維、フィルム、もしくはコーティングへと成形するのに適する形態に調製すること、からなる。

大腸菌 (*Escherichia coli*) 中での所望されるシルク変異体蛋白質の発現が好ましく、それはこの宿主が高レベルの外來性

蛋白質を確実に産生し、かつこの技術は適切な形質転換および発現ベクターを数多く含むためである。しかしながら、別の宿主、および特に増殖培地中への所望される蛋白質の分泌を容易にさせる宿主を提供することは本発明の範囲と無関係ではない。このような別の宿主は、バチルス スブチリス (*Bacillus subtilis*)、サッカロミセス セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、スキゾサッカロミセス ポムベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*)、アスペルギルス エスピーピー (*Aspergillus spp.*)、ハンセンラ エスピーピー (*Hansenula spp.*)、およびストレプトミセス エスピーピー (*Streptomyces spp.*) を含むが、これらには限定されない。



本発明は、大腸菌 ( *E. coli* ) 内でのシルク変異体蛋白質遺伝子の組み立ておよび発現に必要なDNAの複数部分のクローニングに適する様々なプラスミドもしくはベクターを提供する。構築に適するベクターは、選択可能な標識および自律的複製もしくは染色体組込みを可能にさせる配列を含む。その上発現に適するベクターは、異種DNA断片の転写および翻訳を指令する配列を含む。これらのベクターは、転写開始調節領域を宿す異種DNA断片の5'領域、および場合によっては転写停止を調節するDNA断片の3'領域を含む。この両方の調節領域が大腸菌 ( *E. coli* ) に相同な遺伝子から取得される場合が最も好ましいものの、このような調節領域は産生用宿主として選択される特異的な種に本来備わっている遺伝子から取得される必要はないことが理解されている。適切なベクターは、例えば細菌、ウイルス (例えばバクテ

リオファージT7もしくはファージ由来のM-13)、コスミド、イースト、あるいは植物から取得することができる。このようなベクターの取得および使用のためのプロトコールは当業者に知られている (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual-volumes 1, 2, 3, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1989))。

細菌由来のベクターの例には、例えばpBR322、pUC19、pSP64、pUR278、およびpORF1のようなプラスミドベクターが含まれる。適切なウイルス性ベクターの実例は、ファージ、ワクシニア、レトロウイルス、バキュロウイルス、もしくはウシバピローマウイルスから取得されるものである。ファージベクターの例には、 $\lambda^+$ 、 $\lambda$ EMBL3、12001、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、Charon 4a、Charon 40、および $\lambda$ ZAP/Rが含まれる。pXB3およびpSC11はワクシニアベクターの例である (Chakrabarti et al., Molec. Cell. Biol. 5: 3401-9 (1985)、およびMackett et al., J. Virol. 49: 857864 (1984))。繊維状ファージベクターの例は、M13mp

18およびM13mp19のようなM13由来のベクターである。

大腸菌 ( E. coli ) 内でのクモシルク変異体蛋白質の発現のためには細菌由来のベクターが好ましく、この場合pBR322から取得されるプラスミドが最も好ましい。

場合によってはシルク変異体蛋白質を、例えばB. スプチリス ( B.

subtilis ) のような形質転換化宿主の分泌産物として産生することが所望される可能性がある。増殖培地中への所望される蛋白質の分泌は、簡素化されかつ低価格の精製課程という利点を有する。当該技術分野においては、分泌シグナル配列は細胞膜を貫通する発現可能な蛋白質の能動輸送を容易にするのに有用であることがしばしばであることがよく知られている。分泌可能な形質転換化バチルス ( Bacillus ) 宿主の作成は、バチルス ( Bacillus ) 産生宿主内で機能する分泌シグナルをコードするDNA配列を内発現調節性DNAとシルク変異体蛋白質をコードするDNAとの間に存在する発現カセット上に組み込ませ、それを後者を伴う読み枠内に組み込ませることにより達成することができる。B. スプチリス ( B. subtilis ) による多数の異なる異種蛋白質の分泌を可能にするベクターの例が、Nagarajanら、米国特許第4,801,537号、Stephensら、米国特許第4,769,327号、およびBiotechnology Handbook 2、Bacillus、C. R. Harwood、Ed.、Plenum Press、New York (1989) に教示および記載されている。

本発明の分泌ベクターは、転写を調節する調節可能なプロモーター配列、翻訳を調節するリボソーム結合性部位のための配列、および細菌壁を通過するペプチドの転移および成熟蛋白質からのシグナルペプチドの開裂を可能にするシグナルペプチドのための配列を含む。適切なベクターは利用する細菌に適合するものであろう。例えばB. スプチリス ( B. subtilis ) のためには、このような適切なベクターには大腸菌 ( E. coli ) - B. スプチリス ( B. subtilis ) シャ

トルベクターが含まれる。それらは適合性の調節配列および複製起点を有するであろう。それらは多重コピーであり、かつ例えば抗生物質耐性をコードする遺伝子のような選択的マーカー遺伝子を有するであろうことが好ましい。このようなベクターの例は大腸菌 (E. coli) 内にアンピリシンに対する耐性を付与する pTZ18R ファゲミドであり、これは Pharmacia 社、Piscataway, NJ 08854 から入手可能である。プロモーター、リボソーム結合部位、およびシグナルペプチドをコードする DNA 配列は、分泌される産物をコードするいずれかの単一遺伝子からのものであることができる。

プロモーターおよびリボソーム結合部位をコードする DNA 配列はシグナルペプチドをコードするものとは異なる遺伝子からのものであることもできる。プロモーター、リボソーム結合部位、およびシグナルペプチドをコードする DNA 配列を当業者によく知られる手法により単離することができ、そしてその実例が刊行物に記載されている。Biotechnology Handbook 2 Bacillus, C. R. Harwood, Ed., Plenum Press, New York, New York (1989)、を参照せよ。DNA 配列中のプロモーターは構成的もしくは誘導可能ないずれかであり、かつそのために、得られる分泌ベクターが分化的に調節されることを可能にすることができる。

大腸菌 (E. coli) およびバチルス (Bacillus) 内の異種 DNA 断片の発現を稼働するのに有用なプロモーターは多数存在し、そして当業者に知られている。実際にはシルク変異体蛋白質をコードする遺伝子を稼働することが可能ないずれのプロモーターも本発明に適す。

るが、本発明では T7 プロモーターが大腸菌 (E. coli) 内では好ましく、かつ SacB 遺伝子から取得されるプロモーターがバチルス (Bacillus) 内では好ましい。

停止制御領域は、大腸菌 (E. coli) もしくはバチルス (Bacillus) 宿主もしくは場合によっては他の細菌宿主に本来備わっている様々な遺伝子から取得することも可能である。停止制御領域は不要である可能性もあること

は当業者により評価されるであろう。

細菌細胞内への本発明のポリヌクレオチドの組込みのためには、例えばカルシウム透過処理細胞、電気穿孔を用いる形質転換によるか、あるいは組換えファージウイルスを用いるトランスフェクションによるような既知の方法を本発明に従って使用することができる。(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual-volumes 1, 2, 3 (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1989))。

他の既知の方法を利用して、当業者には明らかなように、本発明に従って異種クモシルク蛋白質を発現する組換え宿主細胞を取得することも可能である。

#### クモシルク変異体アミノ酸配列の設計 :

クモシルク変異体蛋白質の設計はネフィラ クラビペス ( Nephila clavipes ) の天然のクモシルクしおり糸蛋白質の線維形成性領域から取得される共通アミノ酸配列に基づいていた。天然のクモしおり糸は、クモの主要瓶状腺から同時に紡がれる2本の異なる蛋白質からなる。両方のしおり糸蛋白質のアミノ酸配列が、Xuら、Proc.

Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 87, 7120 (1990)、ならびにHinmanおよびLewis、J. Biol. Chem. 267, 19320 (1992)により開示されており、そして今後本明細書ではしおり糸蛋白質1 (Dragline Protein-1) (DP-1) およびしおり糸蛋白質2 (Dragline Protein-2) (DP-2) として同定されるであろう。

DP-1断片のアミノ酸配列は反復的であり、そしてグリシンとアラニンに富むが、その他の点ではいずれかの既知のアミノ酸配列とは異なる。この蛋白質の反復性特性および個々の反復物の中の変異体のパターンは図1のように配列を書き直してみるにより強調される。この様式で観察される単一反復物の「共通」配列は、

A GQG GYG GLG XQG A GRG GLG GQG A GAAAAAAGG (配列番号1)

[式中、XはS、GもしくはNであることができる]

である。

図1の調査は、個々の反復物が以下のように一般化することができるパターンに従って共通配列とは異なることを示している。(1) ポリアラニン配列はゼロから7残基までの長さで変化する。(2) 全ポリアラニン配列が欠損する際には、AGRGGGLGGQAGAG nGG (配列番号2) を含む周辺配列もやはり欠損する。(3) ポリアラニン配列とは別に、欠損は一般的には3つの連続残基の整数倍部分を含む。(4) GYGの欠損は一般的には同じ反復物内のGRGの欠損を伴う。(5) 全ポリアラニン配列が欠損している反復物は一般的には、6つのアラニン残基を含む反復物とその前に存在する。

DP-1の合成アナログを設計して、天然の蛋白質の反復性共通配列

と個々の反復物の内の変異体のパターンの両方を模倣した。DP-1の2つのアナログを設計し、そしてDP-1AおよびDP-1Bと表示した。DP-1Aは図2に列挙される縦列反復する101アミノ酸配列でできている。この101アミノ酸「単量体」は、先のパターン(1)～(5)に従って異なる4つの反復物を含む。この101アミノ酸長のペプチド単量体は一連のアナログ蛋白質内で1～16回反復する。DP-1BはDP-1Aの単量体内で4つの反復物を再追加注文することにより設計した。図3に示すこの単量体配列は先の(1)～(5)の規則性の全てを示す。その上、これはDP-1Aによっては共有されていない天然の配列の規則性、すなわちGYGおよびGRGの両方が欠損している反復は、一般的には全ポリアラニン配列を欠損し、かつ一つの介在性反復を伴う反復物とその前に存在する、という規則性を示す。DP-1Bの配列は、DP-1Aと比較してより広い範囲にわたってより密接に天然配列に適合する。

DP-2の断片のアミノ酸配列もやはり反復的であり、そしてやはりグリシンとアラニンに富むが、他の点ではいずれかのこれまでに知られるアミノ酸配列とは異なり、そして連続的アラニン残基の領域を別にするとDP-1とは異なる。この蛋白質の反復性特性および個々の反復物の内の変異体のパターンは、図8の

ように配列を書き直すことにより強調される。このような様式で観察される単一反復物の「共通」配列は [GPGGY GPGQQ] 3GPSGPS A 10 (配列番号 18) である。

図8の調査は、個々の反復物が、以下のように一般化することができるパターンに従って共通配列とは異なることを示している。(1) ポリアラニンに富む配列は6~10残基までの長さで変化する。(2) ポリ

アラニン配列は別にすると、個々の反復物は、ペントペプチド配列 G P G G Y (配列番号3) もしくは G P G Q Q (配列番号4) の一つもしくは両方からなる5つの連続残基の整数倍部分の欠損により共通反復配列とは異なる。

D P - 2 の合成アナログを設計して個々の反復物の内の天然蛋白質の反復性共通配列および変異体のパターンの両方を模倣した。アナログ D P - 2 A は、図9に列挙される縦列反復する 119 アミノ酸配列でできている。この 119 アミノ酸「ペプチド単量体」はパターン(1)~(2)に従って異なる3つの反復物を含む。この 119 アミノ酸長のペプチド単量体は一連のアナログ蛋白質内で 1~16 回反復する。

#### クモシルク変異体蛋白質をコードするDNAの設計 :

設計されたアナログアミノ酸配列をコードするDNA配列を以下の基準に従って創作した。(1) DNA単量体は少なくとも300bpの長さであり、(2) その単量体内ではその配列の反復性は最小限に留められ、17bpを上回る反復配列は伴わず、かつ最小反復性は10bpを上回る配列であり、(3) 可能であればコドンを用意される宿主生物体(大腸菌(*E. coli*))の高発現化遺伝子内に優先的に見いだされるコドンの中から選択するが、ただし釣り合いの取れたA+T/G+C塩基比率を提供するコドンが好ましく、そして(4) その単量体内でのmRNAの予想二次構造が短い種類の塩基対によってよりはむしろ長い種類の相互作用で占められていた。mRNAの二次構造を最少化させるための試みは実施しなかった。

#### D P - 1 および D P - 2 アナログ遺伝子の組み立て :

合成しおり系アナログ遺伝子の組み立ては、まず最初に適切なDNA

単量体の組み立て、およびその後の完全な遺伝子を形成するためのこれらの単量体の重合により達成した。

合成DNA単量体は、先に記載される共通ペプチド単量体が基となっており、4～6までのクローン化二本鎖合成オリゴヌクレオチドを組み立てた。各オリゴヌクレオチドはそのペプチド単量体の異なる部分をコードするように設計した。簡潔に記載すると、オリゴヌクレオチドを各々アンピリシン耐性遺伝子を含む別々の適切なプラスミド内にクローン化した。適切な大腸菌 (*E. coli*) 宿主をプラスミドで形質転換し、そして標準方法により正しいベクターの存在についてスクリーニングした。オリゴヌクレオチドをクローン化した後にDNA単量体を順次組み立てた。個々のオリゴヌクレオチドを含むベクターを消化し、そしてプラスミドDNAをゲル電気泳動により精製した。その後2つの異なるオリゴヌクレオチドを含む精製化プラスミドDNAを連結用条件下でインキュベートし、そしてその連結産物を用いて適切な大腸菌 (*E. coli*) 宿主を形質転換した。これらの形質転換体は縦列に連結される2本のオリゴヌクレオチド配列を含む。4～6のオリゴヌクレオチドを含む完全なDNAモノマーの作成のためには類似の方法を実施した。正しいDNA挿入断片の存在の追加的確認は直接的DNA配列決定により行った。本発明は、DP-1AおよびDP-1Bアナログの産生に有用な数々のDNA単量体を提供する。一般的にはアナログDP-1B、16を産生するのに用いられるDNA単量体が好ましく、それはこの構築物が大腸菌 (*E. coli*) 産生宿主により減多に用いられることのないコドン回避しているためである。

組み立てられたDNA単量体をその後には、本質的にはKempesら

(Gene 39, 239 (1985)) により記載される方法により重合させた。この方法は目的の配列の一連の連続的二倍化からなる。簡潔に記載すると、クローン化オリゴヌクレオチドを含むDNA単量体を適切な制限酵素で消化し、そしてアニール用条件下でインキュベートし、そしてその後連結させて、この単量体の複数反復物を含む一連の構築物を産生する。連結産物を用いて適切な大腸菌 (*E. coli*) 宿主を形質転換し、そして無傷のプラスミドをアンピリ

シン耐性に基づいて選択した。ゲル電気泳動によるプラスミドDNAのその後の分析により、そのDNA単量体の2、4、8、および16縦列反復物を有するプラスミドを含む形質転換体を同定した。これらの蛋白質産物をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、そして天然蛋白質の断片に類似する合成ペプチドに対してウサギ内で作成されたポリクローナル抗血清を用いる免疫化学的染色により検出および定量を行った。

#### 蛋白質の発現および精製：

大腸菌 (*E. coli*) でのクモしおり糸蛋白質アナログの高レベル発現は、よく知られるベクターpET11aから取得されるプラスミドベクターpFP202およびpFP204内への合成遺伝子の挿入により達成した。これらのベクター中ではしおり糸蛋白質をコードする遺伝子が、バクテリオファージT7から取得されるプロモーターにより操作的に連結されるような様式で挿入されている。このプロモーターを、ラクトースもしくはアナログ (IPTG) による調節を付与する大腸菌 (*E. coli*) の *lac* オペレーターから取得される配列と連結させる。大腸菌 (*E. coli*) 宿主株BL21 (DE3) は、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードする遺伝子を保持する

ラムダープロファージを含む。この遺伝子は、やはりラクトースもしくはアナログにより調節されるプロモーターにより制御される。ファージT7のプロモーターに加え、ベクターpFP202およびpFP204は、しおり糸蛋白質をコードする配列に付加される6つの連続的ヒスチジン残基を含むC-末端テイルをコードする配列を提供する。このテイルは、固定化されるNiイオンを保持する樹脂へのそのテイルの吸着を介して、変性条件下でのその蛋白質の親和性精製の手段を提供する。

DP-1アナログ蛋白質は、約5～20%の総蛋白質のレベルで大腸菌 (*E. coli*) により産生された。この内の約20～40%が全長蛋白質として精製化形態で回収された。DP-2アナログ蛋白質は総細胞蛋白質の約5%で産生され、この内の約30%は全長蛋白質として純粋な形態で回収された。

以下の実施例は本発明を説明することが意図されるが、いずれかの様式におい



でも制限として見なされるべきではない。

#### 実施例

##### 一般的方法

新規に工学的に作成された制限部位の位置を図中に示し、そして当業者はこれらの構築物を入手可能な情報を基に再現することができる。

本出願全般にわたり記載される遺伝子および種々のベクターの源は以下の通りである。

抗-DP-1および抗-DP-2抗血清はMultiple Peptide Systems社、San Diego、CA、により調製された。

制限酵素消化、リン酸化、連結反応、形質転換、および本明細書で利

用される遺伝子工学の他の適切な方法は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual—volumes 1、2、3 (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1989)、および遺伝子工学のための市販品として入手可能なキットに付随する説明書に記載されている。

本発明を実施するための細菌培養物およびプラスミドは、市販品として (Novagen) Inc. 社、Madison, WI、から)、あるいは E. coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, the Bacillus Genetic Stock Center, Ohio State University, Columbus, OH、もしくはATCCのいずれかからそれぞれの源と共に入手可能であり、そしてそれらは以下に記載される本文および実施例で同定される。特定されていない限り、以下の実施例中で用いられる標準的試薬および溶液は、Sigma Chemical Co. 社 (St. Louis, MO) により供給された。

アガロースゲルからの制限断片の単離はGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA)

を用い、そして製造業者により指示されるように実施した。

#### 実施例 1

##### 合成遺伝子 DP-1A, 9 および DP-1B, 9 の構築

##### オリゴヌクレオチドの設計およびクローニング :

DP-1A, 9 および DP-1B, 9 をコードする合成遺伝子を、L (配列番号 24、25、および 26)、M1 (配列番号 27、28、および 29)、M2 (配列番号 30、31、および 32)、ならびに S (配列番号 33、34、および 35) と命名される 4 本の二本鎖合成オリゴヌクレオチドから組み立て、これらのオリゴヌクレオチドの配列を図 4 に示す。これらのオリゴヌクレオチドは、5' -OH 基がリン酸化された二本鎖形態で製造業者 (Midland Certified Reagents 社、Midland, TX) により供給された。オリゴヌクレオチドの合成、精製、リン酸化、および二本鎖形態へのアニールの方法は当業者によく知られている。

これらの 4 本の二本鎖オリゴヌクレオチドは、それらをプラスミドベクター pFP510 内に挿入することにより別々にクローン化させた (図 5)。このベクターはプラスミド pA126i から取得され (図 13 を参照せよ)、この全ヌクレオチド配列が配列番号 78 および図 13 に提供される。pA126i の構造の詳細は以下の必須な特性を除けば構築のためには重要ではなく、それらの必須な特性とは、(a) 大腸菌 (*E. coli*) 内で作動する複製起点、(b) この場合抗生物質であるアンピリシンに対する耐性を付与する遺伝子である選択的マーカー、(c) 両者の間に必須な配列が全く含まれない制限エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II のための部位、ならびに (d) 選択的マーカー内に存在し、Bam HI および Bgl II により産生されるものに適合する平滑末端を産生する第三の制限部位 (Pst I)、である。pFP510 の構築のためには、プラスミド pA126i の DNA をエンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II により消化し、その

後に NaI の存在下、GENELEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc 社

、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) を用いてガラスビーズへの吸着により回収した。約0.1 pモルの溶出されるプラスミドDNAに対して10 pモルの二本鎖のリン酸化オリゴヌクレオチドSF4/5を添加した(図5)。この混合物を、連結用条件下でT4ポリヌクレオチドリガーゼと共に4℃で19時間インキュベートした。連結させたDNAをその後にはエンドヌクレアーゼ Xma I で消化していずれかの残存する親のpA126iを直線化し、そしてこれを用いて、Sambrookら(先に引用)により記載されるカルシウム処理により予め受容性にさせてある大腸菌( E. coli ) SK2267 ( E. coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, から取得された) を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体から単離されたプラスミドDNAはエンドヌクレアーゼ Apa I および Bam HIでの別々の消化により特徴決定を行い、そして所望のプラスミドを含む形質転換体を同定し、そしてpFP510と表示した。

プラスミドpFP510のDNAをエンドヌクレアーゼ Sfi I および Dra IIIで消化し、そしてGENELEAN(商標)方法(Bio101, Inc社, P. O. Box 2284, La Jolla, CA)により精製した。約0.1 pモルの溶出化プラスミドDNAに対して二本鎖のリン酸化オリゴヌクレオチド L、M1、M2、もしくはSの内の一つの10 pモルを添加した(図4)。この4本のプラスミド-オリゴヌクレオチド混合物を連結用条件下で4℃で15時間、次いで23℃で20分間インキュベートし、そして最後に連結反応を65

℃

℃での3分間のインキュベーションにより停止させた。連結化DNAのアリコートを用いて大腸菌( E. coli ) SK2267を形質転換し、そしてアンピリシン耐性形質転換体を選択した。図4に示されるオリゴヌクレオチド L、M1、およびM2を含むクローンを、その認識部位がオリゴヌクレオチド内に存在するエンドヌクレアーゼ A1w NIを用いて個々の形質転換体から単離されたプラスミドDNAをスクリーニングすることにより同定した。オリゴヌクレオチ

ド Sを含むクローンは、エンドヌクレアーゼ Bgl I および Dra III を用いて個々の形質転換体から単離されたプラスミドDNAをスクリーニングすることにより同定した。仮想的クローンからのプラスミドDNAは更に、オリゴヌクレオチド配列がそのプラスミド内で正しく取得されていることを立証する目的でエンドヌクレアーゼ Eco RI、Sfi I および Dra III での消化により特性決定した。これらの挿入断片をエンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II で切り出し、そして4%のNuSieveアガロース (FMC) 内での電気泳動により分析して、そのプラスミドがそのオリゴヌクレオチドの単一コピーのみを獲得していることを実証した。正しいクローンを同定し、そしてそれらのプラスミドを、pFP521 (オリゴヌクレオチド L)、pFP533 (オリゴヌクレオチド M1)、pFP523 (オリゴヌクレオチド M2)、およびpFP524 (オリゴヌクレオチド S) と表示した。4つ全てのクローン化オリゴヌクレオチドのDNA配列をDNA配列決定により確認した。

DNA配列決定は本質的には、7-デアザ-GTPと共にDNA配列決定用の Sequanase 2.0キットを用いて、供給元 (U. S.

Biochemicals社) により供給される方法に従って実施した。プラスミドDNAはMagic Miniprepsキット (Promega社) を用いて調製した。鑄型DNAは、40 $\mu$ l (総容量) の0.2M NaOH中で20 $\mu$ lのminiprep DNAを5分間23 $^{\circ}$ Cでインキュベートすることにより変性させた。この混合物を、6 $\mu$ lの2M酢酸アンモニウム (酢酸でpH4.5に調節してある) を添加することにより中性化し、そしてこのDNAを0.15mLのエタノールを添加することにより沈殿させ、遠心分離により回収し、70%の冷却エタノールで洗浄し、そして吸引乾燥させた。配列決定用のプライマーは以下のとおりである。

SI1: 5'-ACGACCTCATCTAT (配列番号5)

SI5: 5'-CTGCCTCTGTCATC (配列番号6)

SI20: 5'-AATAGGCGTATCAC (配列番号7)

プライマーS I 1およびS I 5をp A 1 2 6 i 中の反対の鎖上の部位に対してアニールする。S I 5プライマーは B a m H I 部位の先の31bpから目的の配列への合成を行う。S I 1プライマーは B g l I I 部位の先の38bpから目的の配列への合成を反対の鎖上で行う。ベクターp F P 2 0 6 (以下を参照せよ) 内での配列決定のためには、B g l I I I 部位の先の25bpをアニールするプライマーS I 2 0をS I 1で置換した(図12)。DNA配列決定用のポリアクリルアミドゲルを52℃で泳動した。

遺伝子の組み立て :

サブ配列M 2 Lの組み立てのためには、プラスミドp F P 5 2 3 (M 2) をエンドヌクレアーゼ P s t I および D r a I I I で消化し、

そしてプラスミドp F P 5 2 1 (L) をエンドヌクレアーゼ P s t I および S f i I で消化した。消化されたプラスミドDNAを1.2%のアガロース(低融点、B i o R a d 社)ゲル内での電気泳動により分画化した。オリゴヌクレオチド配列を含み、相対的サイズにより同定された臭化エチジウム染色化バンドを切り出し、その切り出したバンドを合わせ、そしてDNAを溶かしたアガロースからGENECLEAN (商標) 方法 (B i o 1 0 1, I n c 社, P. O. B o x 2 2 8 4, L a J o l l a, C A) により回収した。溶出して合わせたDNA断片を連結用条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 (E. c o l i) W 3 1 1 0 (大腸菌 (E. c o l i) Genetic S t o c k C e n t e r, Y a l e U n i v e r s i t y, N e w H a v e n, C T, から取得された) を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ B a m H I および B g l I I で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そしてp F P 5 2 5 と表示した。

サブ配列M S 1の組み立ては、プラスミドp F P 5 3 3 ( P s t I および D r a I I I で消化した) ならびにp F P 5 2 4 ( P s t I および S f i I で消化した) で開始させて、同一様式で達成した。M S 1サブ配列を含むプラス

ミドを同定し、そしてpFP531と表示した。

DNA単量体 (M2LM1S) の組み立てのためには、プラスミドpFP525 (M2L) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Dra

IIIで消化し、そしてプラスミドpFP531 (M1S) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Sfi I で消化した。消化したプラスミドDNAを、1.2%の低融点アガロースゲル内での電気泳動により分画化した。M2LおよびM1S配列を含み、各々相対的サイズにより同定された臭化エチジウム染色化バンドを切り出し、その切り出したバンドを合わせ、そしてDNAを溶かしたアガロースからGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc社, P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。溶出して合わせたDNA断片を連結用条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) W3110を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そしてpFP534と表示した。プラスミドpFP523、pFP521、pFP533、pFP524、pFP525、pFP531、pFP534中のDNA挿入断片は、既述のように直接的DNA配列決定により確認した。

#### 遺伝子の重合 :

合成遺伝子はpFP534中の単量体配列で出発して逐次的二倍化を行うことにより拡張した。いずれかの挿入断片配列の二倍化を行うためには、プラスミドDNAのアリコートをエンドヌクレアーゼ Pst I および Dra IIIで消化し、そして同一プラスミドの別のアリコートをエンドヌクレアーゼ Pst I および Sfi I で消化した。消化物を低融点アガロース上での電気泳動により分画化し、そして挿入断片

配列を含む臭化エチジウム断片をそれらの相対的サイズにより同定した。幾つかの事例においては2つの断片が十分に分離しておらず、そのため第三の酵素で挿

入断片非含有性分画を切断する必要がある、そのような第三の酵素は通常 Mu I であった。

この2つの挿入断片配列含有性分画はエンドヌクレアーゼ Pst Iにより作成された一つの末端を有する。これらの適合性一本鎖末端のアニールおよび連結は、その一部分が各断片上に保持されているアンピリシン耐性を付与する遺伝子の再構築をもたらす。各分画のもう一つの末端は、Dra IIIもしくはSf Iのいずれかにより作成される一本鎖配列を示す。これらの配列は故意に相補的となっており、そしてアニールおよび連結は、2つの挿入断片配列の頭一尾結合を、その連結部位での両方の部位の喪失を伴いながらもたらす。この方法の挿入断片配列二倍化の原理はKempら (Gene 39, 239-245 (1985)) により記載されている。

電気泳動により精製され、そしてGENECLEAN (商標) 方法 (Bio 101, Inc社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収されたこの2つの挿入断片含有性断片を合わせ、そして連結条件下でインキュベートした。アリコートを使用して大腸菌 (E. coli) W3110を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HIおよびBgl IIで消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定した。

この方法により、一連のDP-1AアナログをコードするDNA単量

体配列M2LM1Sの2、4、8、および16回縦列反復物を含む一連のプラスミドを構築した。その上、類似方法を使用して一続きのDP-1Bアナログをコードする遺伝子を構築した。この目的のためには、サブ配列SL (pFP524およびpFP521から) ならびにM1M2 (pFP533およびpFP523から) を最初に構築し、その後これらを合わせて単量体SLM1M2を形成し、これを既述のように重合させた。適合性末端 (相補的一本鎖末端もしくは平滑末端) を作成する制限エンドヌクレアーゼのための開裂部位によりサブ配列が結合されるとすると、類似方法を使用してベクターpFP510もしくは他のい

れかの適切なベクター中に保持されるサブ配列のいずれかの組み合わせ物を組み立てることができることが明白であるはずである。様々な単量体配列に加え、その単量体配列のいずれかの数の反復物の重合体を、様々なサイズの挿入断片を含むプラスミドで開始する同一方法で組み立てることができる。

## 実施例 2

### 合成遺伝子 DP-1B. 16

DP-1Bをコードする第二群の遺伝子はDP-1B. 16と表示され(配列番号82)、これは高度に発現される大腸菌 (*E. coli*) 遺伝子においてほとんど用いられることのないコドン数を減らすために設計したが、これは同時に同一の反復性配列の蛋白質をコードしている。DP-1B. 16ペプチド単量体の配列を図10および配列番号82に示す。

### オリゴヌクレオチドの合成およびクローニング

DP-1B. 16をコードする合成遺伝子(配列番号82)は4本の

二本鎖合成オリゴヌクレオチドから組み立て、それらのオリゴヌクレオチドの配列(配列番号64、65、66; 配列番号67、68、69; 配列番号70、71、72; および配列番号73、74、75)を図11に示す。これらのオリゴヌクレオチドは、5'-OH基がリン酸化されていない一本鎖形態で製造業者(Midland Certified Reagents社、Midland, TX)により供給された。二本鎖形態へのアニールのためには、相補的一本鎖オリゴヌクレオチド(各667pモル)を、0.01MのTris-HCl、0.01MのMgCl<sub>2</sub>、0.05MのNaCl、0.001Mのジチオスレイトールを含む0.2mLの緩衝液、pH7.9、中に混合した。この混合物を沸騰水中で1分間加熱し、その後に約3時間にわたりゆっくりと23°Cに冷ませた。

4本の二本鎖オリゴヌクレオチドは、プラスミドベクターpFP206中にそれらを挿入することにより別々にクローン化した(図12)。このベクターは図12に説明されるようにプラスミドpA126iから取得した。簡潔に記載すると、プラスミドpA126iのDNAをエンドヌクレアーゼ *Bam* HIおよび *Eco* RIで消化し、そしてこの2つの断片を1.2%のアガロース(低融点



、BioRad社)中の電気泳動により分離した。その2つの断片の内の長い方を臭化エチジウム染色化ゲルから切り出し、そしてGENECLEAN (商標)方法 (Bio101、Inc社、P. O. Box 2284、La Jolla、CA)により回収した。溶出されたDNA断片の約0.1 pモルに10 pモルの二本鎖でのリン酸化オリゴヌクレオチドSF31/32を添加した (図12)。この混合物を連結条件下でT4ポリヌクレオチド

と共に4℃で8.5時間インキュベートした。連結されたDNAを用いて、カルシウム処理により予め受容性にさせてあった大腸菌 (*E. coli*) HB101を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体から単離されたプラスミドDNAを、エンドヌクレアーゼ *Hind* III、*Eco* RI、*Bgl* II、および*Bam* HIでの個別の消化により特徴決定し、そして所望のプラスミドを含む形質転換体を同定し、そしてpFP206と表示した。

プラスミドpFP206のDNAをエンドヌクレアーゼ *Bam* HIおよび*Bgl* IIで消化し、そしてGENECLEAN (商標)方法 (Bio101、Inc社、P. O. Box 2284、La Jolla、CA)により精製した。溶出されたプラスミドDNAの約0.1 pモルに二本鎖オリゴヌクレオチド 1 (配列番号64、65、66)、2 (配列番号67、68、69)、3 (配列番号70、71、72)、もしくは4 (配列番号73、74、75)の内の一つの10 pモルを添加した。この4つのプラスミド-オリゴヌクレオチド混合物を連結条件下で4℃で15時間インキュベートし、その後に連結反応を70℃で3分間のインキュベーションにより停止した。その後に連結化DNAをエンドヌクレアーゼ *Hind* IIIで消化していずれかの残存性親pFP206を直線化した。連結化DNAのアリコートを用いて大腸菌 (*E. coli*) HB101を形質転換し、そしてアンピリシン耐性形質転換体を選択した。オリゴヌクレオチド 1、2、3、もしくは4を含むクローンを、エンドヌクレアーゼ *Bam* HIおよび*Pst* Iを用いて個々の形質転換体から単離されたプラスミドDNAをスクリーニングすることにより同定した。所望される向きの挿入断片を含むプラスミ

ド中ではpFP206の2つの Bam HI-Pst I断片の内の短い方をクローン化オリゴヌクレオチドの長さまで伸長させた。仮想的クローンからのプラスミドDNAは、エンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl IIでの消化、ならびに3%のNuSieveアガロース (FMC)、1%のアガロース (Agarose) (Sigma Chemical Co. 社) 中の電気泳動による分析により更に性質決定を行って、このプラスミドが正しい配向でオリゴヌクレオチドの単一コピーのみを獲得していることを確認した。正しいクローンを同定し、そしてそれらのプラスミドを、pFP636 (オリゴヌクレオチド 1)、pFP620 (オリゴヌクレオチド 2)、pFP641 (オリゴヌクレオチド 3)、およびpFP631 (オリゴヌクレオチド 4) と表示した。4つ全てのクローン化オリゴヌクレオチドの配列を既述の要領でDNA配列決定により確認した。

#### 遺伝子の組み立て :

サブ配列 1, 2の組み立てのためには、プラスミドpFP (1) をエンドヌクレアーゼ Pst Iおよび Bam HIで消化し、そしてプラスミドpFP620 (2) をエンドヌクレアーゼ Pst Iおよび Bgl IIで消化した。消化したプラスミドDNAを1.2%のアガロース (低融点、BioRad社) ゲル中での電気泳動により分画化した。オリゴヌクレオチド配列を含み、それぞれの相対的サイズにより同定された臭化エチジウム染色化バンドを切り出し、切り出されたバンドを合わせ、そしてDNAを溶かしたアガロースからGENECL EAN (商標) 方法 (Bio101, Inc社, P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。溶出して合わせたDNA断片

を連結用条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB101を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl IIで消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そしてpFP647と表示した。

サブ配列 3, 4の組み立ては、プラスミドpFP641 ( Pst I および Bam HIで消化した) ならびにpFP631 ( Pst I および Bgl I Iで消化した) で出発して、同一様式で達成した。3, 4サブ配列を含むプラスミドを同定し、そしてpFP649と表示した。

DNA単量体 (1, 2, 3, 4) の組み立てのためには、プラスミドpFP647 (1, 2) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Bam HIで消化し、そしてプラスミドpFP640 (3, 4) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Bgl I Iで消化した。消化したプラスミドDNAを1, 2%の低融点アガロースゲル中での電気泳動により分画化した。1, 2および3, 4の配列を含み、それぞれ各相対的サイズにより同定された臭化エチジウム染色化バンドを切り出し、切り出したバンドを合わせ、そしてDNAを溶かしたアガロースからGENE CLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc社, P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。溶出して合わせたDNA断片を連結用条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 ( E. coli ) HB101を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl I Iで消

化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そしてpFP652と表示した。プラスミドpFP652中のDNA挿入断片を既述の要領で直接的DNA配列決定により確認した。

#### 遺伝子の重合 :

合成遺伝子を、pFP652中の単量体配列で開始して逐次的二倍化により拡張した。いずれかの挿入断片配列を二倍化するためには、プラスミドDNAのアリコートをエンドヌクレアーゼ Pst I および Bam HIで消化し、そして同一プラスミドの別のアリコートをエンドヌクレアーゼ Pst I および Bgl I Iで消化した。消化物を低融点アガロース上での電気泳動により分画化し、そして挿入断片配列を含む臭化エチジウム染色化断片をそれらの相対的サイズに

より同定した。電気泳動により精製され、そしてGENECLEAN (商標) 方法 (Bio 101, Inc 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収された2つの挿入断片含有性断片を合わせ、そして連結用条件下でインキュベートした。三回目の二倍化では Bam HI 消化物中の2つの断片は十分に分離しておらず、そのため溶出されたバンドは両方の断片を含んでいた。この場合には二倍過剰の Bgl II - Pst I 断片を連結に用いた。連結化DNAのアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB101を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分離した。予想サイズの挿入断片を含むプラスミドを同定した。

この方法により、一連のDP-1B、16アナログをコードする、DNA単量体配列 1 (配列番号64、65、66)、2 (配列番号67、68、69)、3 (配列番号70、71、72)、4 (配列番号73、74、75) の2、4、8、および16回縦列反復物を含む一連のプラスミドを構築した。これらのプラスミドを各々、pFP656 (2回反復物)、pFP661 (4回反復物)、pFP662 (8回反復物)、およびpFP665 (16回反復物) と表示した。

### 実施例3

#### 合成遺伝子DP-2A

#### オリゴヌクレオチドの合成およびクローニング

DP-2Aをコードする合成遺伝子を6本の二本鎖合成オリゴヌクレオチドから組み立て、それらのオリゴヌクレオチド配列を図7に示す。これらのオリゴヌクレオチドは5' -OH基がリン酸化されていない二本鎖形態で製造業者 (Midland Certified Reagents 社、Midland, TX) により供給された。この6本の二本鎖オリゴヌクレオチドは、それらを別々にプラスミドベクターpFP206内に挿入することによりクローン化した。

プラスミドpFP206のDNAをエンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II で消化し、そしてGENECLEAN (商標) 方法 (Bio 101、

Inc社、P. O. Box 2284、La Jolla、CA) により精製した。溶出されるプラスミドDNAの約0.1 pモルに、二本鎖オリゴヌクレオチドA (配列番号41、42、43)、B (配列番号44、45、46)、C (配列番号47、48、49)、D (配列番号50、51、52)、E (配列番号53、54、55)、

もしくはF (配列番号56、57、58) の内の一つの10 pモルを添加した。この6つのプラスミド-オリゴヌクレオチド混合物を連結条件下で4℃で15時間インキュベートし、その後に連結反応を70℃3分間のインキュベーションにより停止させた。連結化DNAをその後にエンドヌクレアーゼ Hind III で消化していずれかの残存性親pFP206を直線化した。連結化DNAのアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB101を形質転換し、そしてアンピリシン耐性形質転換体を選択した。オリゴヌクレオチド A、B、C、D、E、もしくはFを含むクローンを、エンドヌクレアーゼ Bam HI および Pst I で個々の形質転換体から単離されたプラスミドDNAをスクリーニングすることにより同定した。所望される向きに挿入断片を含むプラスミドの中で、pFP206の2つの Bam HI - Pst I 断片の内の短い方をクローン化オリゴヌクレオチドの長さまで伸長させた。仮想的クローンからのプラスミドDNAは、エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II での消化、ならびに3%のNUSIEVEアガロース (FMC)、1%のアガロース (Agarose) (Sigma Chemical Co. 社) 中の電気泳動による分析により更に特徴決定を行い、そのプラスミドが正しい配向にオリゴヌクレオチドの単一コピーのみを獲得したことを確認した。正しいクローンを同定し、そしてそれらのプラスミドを、pFP193 (オリゴヌクレオチド A)、pFP194 (オリゴヌクレオチド B)、pFP195 (オリゴヌクレオチド C)、pFP196 (オリゴヌクレオチド D)、pFP197 (オリゴヌクレオチド E)、およびpFP198 (オリゴヌクレオチド F) と表示した。

遺伝子の組み立て :

サブ配列ABの組み立てのためには、プラスミドpFP193 (A) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Pvu II で消化し、そしてプラスミドpFP194 (B) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Sma I で消化した。消化したプラスミドDNAを1.2%のアガロース (低融点、BioRad社) ゲル中の電気泳動により分画化した。オリゴヌクレオチドを含み相対的サイズにより同定された臭化エチジウム染色化バンドを切り出し、切り出したバンドを合わせ、そしてDNAを溶かしたアガロースからGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc社、P.O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。溶出して合わせたDNA断片を連結条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB101を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そしてpFP300 (AB) と表示した。

サブ配列CDの組み立ては、プラスミドpFP195 ( Pst I および Sna BI で消化した) ならびにpFP196 ( Pst I および Sma I で消化した) で出発する同一様式で達成した。CDサブ配列を含むプラスミドを同定し、そしてpFP578と表示した。サブ配列EGの組み立ては、プラスミドpFP197 ( Pst I および Sna BI で消化した) ならびにpFP198 ( Pst I および Sma I で消化した) で出発する同一様式で達成した。EFサブ配列を含むプラ

スミドを同定し、そしてpFP583と表示した。プラスミドpFP300、pFP578、およびpFP583中のDNA挿入断片を、先に記載される要領で直接的DNA配列決定により確認した。

サブ配列CDEFの組み立ては、プラスミドpFP578 ( Pst I および Pvu II で消化した) ならびにpFP583 ( Pst I および Sma I で消化した) で出発する同一様式で達成した。CDEFサブ配列を含むプラスミドを同定し、そしてpFP588と表示した。

DNA単量体 (A B C D E F) の組み立てのためには、プラスミド p F P 3 0 0 (A B) をエンドヌクレアーゼ P s t I および P v u II で消化し、そしてプラスミド p F P 5 8 8 (C D E F) をエンドヌクレアーゼ P s t I および S m a I で消化した。消化したプラスミド DNA を 1. 2 % の低融点アガロースゲル中の電気泳動により分画化した。A B および C D E F 配列をそれぞれ含み、それらの相対的サイズにより同定された臭化エチジウム染色化バンドを切り出し、切り出したバンドを合わせ、そして DNA を溶かしたゲルから GENE CLEAN (商標) 方法 (B i o 1 0 1, I n c 社、P. O. B o x 2 2 8 4, L a J o l l a, C A) により回収した。溶出して合わせた DNA 断片を連結条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 (E. c o l i) H B 1 0 1 を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミド DNA を数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ B a m H I および B g I II で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そして p F P 3 0 3 と表示した。プラスミド p F P 3 0 3 中の DNA 挿入断片を直接的 DNA 配列決定により確認

した。

#### 遺伝子の重合：

合成遺伝子は、p F P 3 0 3 中の単量体配列で開始して、逐次二倍化により拡張させた。いずれかの挿入断片配列を二倍化するためには、プラスミド DNA のアリコートをエンドヌクレアーゼ P s t C I および P v u II で消化し、そして同一プラスミドの別のアリコートをエンドヌクレアーゼ P s t I および S m a I で消化した。消化物を低融点アガロースゲル中の電気泳動により分画化し、そして挿入断片配列を含む臭化エチジウム染色化断片をそれらの相対的サイズにより同定した。電気泳動により精製され、そして GENE CLEAN (商標) 方法 (B i o 1 0 1, I n c 社、P. O. B o x 2 2 8 4, L a J o l l a, C A) により回収された 2 つの挿入断片含有性断片を合わせ、そして連結条件下でインキュベートした。連結化 DNA のアリコートを用いて大腸菌 (E. c

o l i) HB101を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。

プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl IIで消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想されるサイズの挿入断片を含むプラスミドを同定した。

この方法により、一連のDP-2アナログをコードするDNA単量体配列A B C D E Fの2、4、8、および16回縦列反復物を含む一連のプラスミドを構築した。これらのプラスミドをそれぞれ、pFP304 (2回反復物)、pFP596 (4回反復物)、pFP597 (8回反復物)、およびpFP598 (16回反復物)と表示した。

#### 実施例4

#### 大腸菌 (E. coli) 免疫アッセイにおけるDP-1およびDP-2アナログ遺伝子の発現

DP-1アナログアミノ酸配列の検出のためには、ポリクローナル抗血清を、天然蛋白質の共通反復配列内の最も高度に保存されるセグメントに適合する合成ペプチドで免疫することによりウサギ内で作成した。ペプチド (配列CGAGQGGYGG LGSQGAGRG-NH<sub>2</sub>) (配列番号8) を標準的固相方法 (Multiple Peptide Systems社、San Diego, CA) により合成し、そしてその末端Cysチオールを通してマレイミド-ベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを介してカサガイ (Keyhole Limpet) ヘモシアニンに結合させた。同様にDP-2アナログアミノ酸配列の検出のためには、抗血清を、天然蛋白質DP-2の共通反復配列を反映する配列CGPGQQGGYGGPQQGPS-NH<sub>2</sub> (配列番号9) のペプチドに対して作成した。

産生レベルを評定するための培養物の増殖のためには、125mLのバツフル付きエーレンマイヤー (Erlenmeyer) フラスコ内の、0.1mg/mLのアンピリシンを含む20mLのLブイヨン (リットル当たり: 10gのバクトトリプトン (Bacto-Tryptone) (Difco社)、5gのバクトーイースト エキストラクト (Bacto-Yeast Extract) (Difco社)、5gのNaCl、NaOHでpHを7.0に調節してある)



に、0.1 mg/ml のアンピリシンを含む L-アガープレートで 37℃ で一晚増殖させてあり、そのプレートから溶出され、細胞を用いて約 0.05 の吸光度 (A<sub>600 nm</sub>) で接種した。この培養物を、A<sub>600 nm</sub> が約 1.0 に達す

るまで 37℃ で震盪し、1.0 に達した時点で IPTG を 1 mM の最終濃度になるまで添加した。試料 (0.5 mL) を IPTG 添加の直前および 37℃ での追加的 3 時間置いた後に採取した。細胞をマイクロフージ内での遠心分離により即座に回収し、上清を除去し、そして細胞ペレットをドライアイス内で凍結させ、そして -70℃ に保存した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析のためには、細胞ペレットを解凍し、0.2 mL の試料調製用緩衝液 (0.0625 M のトリス-HCl、pH 6.8、2% w/v の Na-ドデシル硫酸塩、0.0025% w/v のプロモフェノールブルー、10% v/v のグリセロール、2.5% v/v の 2-メルカプトエタノール) 中に懸濁させ、そして沸騰水浴中で 5 分間インキュベートした。アリコート (15 μl) を 4~12% の濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (Novex 社) にのせ、そして染料先端がゲルの底部から 1 cm を下回る距離になるまで電気泳動に供した。このゲルをクーマシーブリリアントブルー (Coomassie Brilliant Blue) で染色した。第二ゲル (6% アクリルアミド) を類似の試料で泳動させ、その後に蛋白質バンドを電気泳動的にニトロセルロースのシートに、Idea Scientific, Inc 社により製造される装置を使用して転移させた。転移用の緩衝液は 3.03-g のトリスヒドロキシメチルアミノメタン、14.4-g のグリシン、0.1% w/v の SDS、25% v/v のメタノールを含む (リットル当たり)。

ニトロセルロースプロットを以下の要領で免疫化学的に染色した。そのシート上の蛋白質結合部位を「プロット (Blotto)」(トリス-食塩水 (0.1 M のトリス-HCl、pH 8.0、0.9% w/v

の NaCl) 中の 3% の無脂肪乾燥乳、0.05% の TWEEN 20) と共に 30 分間室温、震盪台上でのインキュベーションにより遮断した。その後にこの

プロットを、「プロット (Blotto)」中で1:1000に希釈した抗DP-1血清もしくは抗-DP-2血清と共に1時間インキュベートし、トリス-食塩水で洗浄し、そして「プロット (Blotto)」中で1:1000に希釈したセイヨウカラシパーオキシダーゼ結合化ヤギ抗-ウサギIgG血清 (Kierkegaard and Perry Laboratories社、Gait hersburg, MD) と共に1時間インキュベートした。再度トリス-食塩水で洗浄した後はこのプロットを、24 mLのトリス-食塩水および30  $\mu$ lの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加してある6 mLのメタノール中の18 mgの4-クロロ-1-ナフトールの溶液に露出した。

DP-1抗原産生の定量化のためには、細胞抽出物を2つの方法のいずれかにより調製した。

方法1: 0.5 mLの培養物からの細胞ペレットを0.084 mLの50 mM EDTA、pH 8.0、中に再懸濁させ、その後にこれに、同一緩衝液中の10  $\mu$ lの10 mg/mLの卵白、エタノール中の1  $\mu$ lの2 mg/mLのウシ臍臓リボヌクレアーゼ、および5  $\mu$ lの0.1 Mフッ化フェニルメタンスルホニルを添加した。37°Cで15分置いた後に1  $\mu$ lの1 mg/mL DNase Iを3  $\mu$ lの1 M MgCl<sub>2</sub>、1 M MgSO<sub>4</sub>と共に添加し、そしてインキュベーションを37°Cで10分間継続した。得られる溶菌物をマイクロフュージ内での5分間の遠心分離により清澄化し、そして上清をトリス-食塩水で0.5 mLに希釈した。

方法2: 細胞ペレットを、6 Mのグアニジン-HCl、0.1 MのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01 Mのトリス-HCl、5 mMの2-メルカプトエタノールを含み、pHをNaOHで8.0に調節してある0.5 mLの緩衝液8.0 G中に再懸濁させた。完全な混合および23°Cでの1時間のインキュベーションの後に、細胞破片をマイクロフュージ内での15分間の遠心分離により除去した。

トリス-食塩水 (方法1) もしくは緩衝液8.0 G (方法2) 中の系列希釈物のアリコート (1  $\mu$ l) を、様々な濃度の精製化DP-1の8量体 (101アミノ酸残基の8回反復物) の標準溶液と共にニトロセルロース上にスポットした。

その後、このニトロセルロースシートを先に記載する要領でウエスタンブロット用に処理した。各試料中のDP-1抗原の濃度を、標準スポットの内の一つの色強度と適合させることにより評定した。

産生株：

ベクター：

DP-1の産生のための細菌株を構築するためには、クローン化合成DP-1-コード化DNA配列を、Studierら、Methods in Enzymology、185、60（1990）のプラスミドpET11aおよびpET9aから取得されるプラスミドpFP200から順次取得されるプラスミドベクターpFP202（図6）もしくはpFP204中に挿入した。プラスミドpET9aおよびpET11a、ならびに宿主株BL21、BL21（DE3）、HMS174、およびHMS174（DE3）はNovagen社、Madison、WI、から取得した。

プラスミドpFP200を構築するためには、プラスミドpET9aおよびpET11aのDNAをエンドヌクレアーゼ EcoRIおよび AlwNIで消化し、その後に消化物を低融点アガロース中での電気泳動により別々に分画化した。適切な臭化エチジウム染色化バンド（pET9aからはカナマイシンに対する耐性を付与する遺伝子を保持するバンド、およびpET11aからはT7プロモーターを保持するバンド）をサイズにより同定し、切り出し、そして溶かしたゲル切片からGENECLEAN（商標）方法（Bio101、Inc. 社、P.O. Box 2284、La Jolla、CA）により回収した。精製された各DNAバンドの等量を合わせ、そして連結用条件下でインキュベートした。連結化DNAのアリコートを用いて大腸菌（E. coli）BL21を形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン（50  $\mu$ g/mL）に対する耐性について選択した。個々の形質転換体からのプラス

ミドDNAをエンドヌクレアーゼ ClaIでの消化後に分析し、そして正しいものを同定し、そしてそれをpFP200と表示した。

6つの連続するヒスチジン残基をコードする次なるDNA配列をpFP200  
中に挿入した。このような配列は、以下の配列、

G S H H H H H S R (配列番号10)

5' HO-GATCCCATCACCATCACCATCACTCTA (配列番号11)

GGTAGTGGTAGTGGTAGTGAGATCTAG-OH 5' (配列番号12)

を用いて合成二本鎖オリゴヌクレオチド(SF25/26)上に保持させた。

pFP200の Bam HI部位内に正しい向きで挿入される際のこのオリゴ  
ヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を一文字コードでDNA配列の上  
に重ねて示す。pFP200のDNAをエンドヌクレアーゼ Bam HIで消化  
し、そしてGENECLEAN (商標) 方法(Bio101, Inc. 社、P.  
O. Box 2284, La Jolla, CA)により回収した。この消化D  
NAのアリコート(約0.02pモル)を、5'端がリン酸化されていないオリ  
ゴヌクレオチドSF25/26(10pモル)と混合した。4°Cで5時間、次い  
で23°Cで20分間の連結条件下でのインキュベーションの後に、このアリコー  
トを用いて大腸菌(E. coli)BL21を形質転換した。カナマイシン耐  
性について形質転換体を選択し、そして個々の形質転換体のプラスミドDNAを  
エンドヌクレアーゼ Eco RIおよび Bam HIでの消化後に分析した。正  
しいプラスミドを、所望される向きでの挿入により生じ、そのオリゴヌクレオチ  
ド配列のプロモーター近接端での Bam HI部位の復元の指標となるDNAバ  
ンドが消化物中に存在す

ることにより同定した。このプラスミドをpFP202と表示した。オリゴヌク  
レオチドの正しい挿入を、既述の要領で直接的DNA配列決定により確認した。

プラスミドベクターpFP202は、以下の配列、

G S H H H H H H (配列番号13)

5' HO-GATCCCATCACCATCACCATCACTAAA (配列番号14)

GGTAGTGGTAGTGGTAGTGATTCTAG-OH 5' (配列番号15)

を用いて合成二本鎖オリゴヌクレオチドをpFP202内に挿入することによる類似の様式で構築した。このオリゴヌクレオチドは6縦列His残基のすぐ隣に停止コドン配置してある。

DP-1A, 9株 :

DP-1Aをコードする次なる配列は、T7プロモーターとHisの6量体をコードする配列との間に位置する Bam HI部位でpFP202内に挿入した。プラスミドpFP534 (101aa DP-1Aをコードする)、pFP538 (101aa DP-1Aの2回反復物をコードする)、およびpFP541 (101aa DP-1Aの8回反復物をコードする) をエンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl IIで消化し、そしてpFP546 (101aa DP-1Aの16回反復物) を Bam HI、Bgl II、および Eco RIで消化した。これらの消化物を低融点アガロース中での電気泳動により分画化し、そしてDP-1-コード化配列を保持する臭化エチジウム染色化バンドをサイズにより同定し、そして切り出した。切り出したバンドを溶かし、そしてその各々に、エンドヌクレアーゼ Bam HIで予め消化してあるpFP202 DNAのアリコートを追加した。DNAをGE

NECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社, P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収し、そして4℃で2時間、次いで23℃で20分間の連結条件下でインキュベーションした。連結化DNAのアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) を形質転換し、そして形質転換体をカナマイシンに対する耐性について選択した。

個々の形質転換体をカナマイシンを含むLBアガーの表面上の酢酸セルロースのシート上にパッチした。一晩の増殖後にはこの酢酸セルロースを、ニトロセルロースのシートが1mMのIPTGを含むLBアガーの表面に置かれている第二プレートに移した。37℃で3時間のインキュベーション後、このニトロセルロースシートを酢酸セルロースの下から取り出し、「プロット (Blotto)」で遮断し、そして以下に記載される要領で抗DP-1血清での免疫化学的染色により発色させた。このコロニー免疫アッセイにおける青色により同定される

陽性形質転換体を、免疫アッセイプレートと同時に同一の形質転換体コロニーを接種してあるレプリカマスタープレートから拾い出した。陽性形質転換体からのプラスミドDNAの正しい構造を、エンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl I I Iでの消化後に確認した。DP-1-コード化挿入断片が逆向きに挿入されている形質転換体（消化物中での適切なサイズのバンドの形成により同定される）はコロニー免疫アッセイにおいて陽性反応を生じるが、生じる色は正しい配向のものと比較すると顕著に強度が劣っていた。正しい向きの挿入断片を伴うプラスミドを含む形質転換体を同定し、そしてFP3211（101aaの1回反復物）、FP3217（2回反復物）、FP3203（8回反復物）、およびF

P3206（16回反復物）と表示した。

株FP3217、FP3203、およびFP3206により産生されるDP-1蛋白質を、以下に記載する要領でウエスタンブロット分析によりアッセイした。全てのものが、抗-DP-1血清により検出される予想サイズの全長蛋白質を産生することが示された。その上、通常の一連の抗DP-1-染色用蛋白質バンドは主に大きめのゲル移動度で観察された。

DP-1B. 9株 :

DP-1B. 9の産生用の大腸菌（E. coli）株は、DP-1B. 9をコードするDNA断片（配列番号81）（それぞれ303bpのDNA単量体の8および16回反復物を含むプラスミドpFP156およびpFP158の Bam HIおよび Bgl I I Iでの消化により取得される）の、プラスミドpFP202中への転移による類似の様式で構築した。得られる産物株をFP2121（8回反復物）およびFP2123（16回反復物）と表示した。両方の株共が、ウエスタンブロット分析により、予期サイズの全長蛋白質を産生することが示された。

DP-1B. 16株 :

DP-1B. 16（配列番号82）の産生用の大腸菌（E. coli）株は、DP-1B. 16をコードするDNA断片（それぞれ303bpのDNA単量体の8および16回反復物を含むプラスミドpFP662およびpFP665の

Bam HI および Bgl II での消化により取得される) の、プラスミド pFP204 中への転移による類似の様式で構築した。得られる産物株を FP3350 (8 回反復物) および FP3356 (16 回反復物) と表示した。両方の株共、予想サイズの

全長蛋白質を産生することがウエスタンブロット分析により示された。宿主細胞 FP3350 は、ブダペスト条約の取り決めにより ATCC に寄託してあり、そして ATCC 番号 ATCC69328 により同定される (1993 年 6 月 15 日に寄託)。

#### DP-2A 株 :

DP-2A の産生のための大腸菌 ( E. coli ) 株は、DP-2A をコードする DNA 断片 (それぞれ 357 bp の DNA 単量体の 8 回および 16 回反復物を含むプラスミド pFP597 および pFP598 の Bam HI および Bgl II での消化により取得される) の、プラスミド pFP204 内への転移による類似の様式で構築した。得られる産生株を FP3276 (8 回反復物) および FP3284 (16 回反復物) と表示した。両方の株共、予想サイズの全長蛋白質を産生することがウエスタンブロット分析により示された。

#### 実施例 5

##### 組換えシルク変異体蛋白質の大量産生、精製、および定量化

#### DP-1A<sub>9</sub> (配列番号 80) の精製 :

株 FP3203 は、Fermgen 発酵装置 (New Brunswick Scientific 社、New Brunswick、NJ) 内の、

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0 g
MgSO <sub>4</sub>	4.5 g
Naクエン酸塩・2H <sub>2</sub> O	0.47 g
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.25 g
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.26 g

チアミン-HCl	0.6 g
----------	-------

カザアミノ酸	200 g
ビオチン	0.05 g
$K_2HPO_4$	19.5 g
$NaH_2PO_4$	9.0 g
グリセロール	100 g
L-アラニン	10.0 g
グリシン	10.0 g
グルコース	200 g
PPG	5 mL
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.08 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.03 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.025 g
$H_3BO_3$	0.0015 g
$(NH_4)_2MO_x$	0.001 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0006 g

を含む10 Lの培地中で増殖させた。

この発酵装置に、同一培地中のFP3203の500 mLの一晩培養物を接種した。5 NのNaOHもしくは20%の $H_3PO_4$ の添加によりpHを6.8に維持した。600 nmにおける吸光度が10~15に達した際に、DP-1の産生を5 gのIPTGを添加することにより誘導した。3時間後に細胞を遠心分離により採取し、そして凍結した。収量は314 gの細胞ペーストであった。解凍した細胞(100 gのペースト)を、6 Mのグアニジン-HCl、0.1 Mの $NaH_2PO_4$ 、0.0

1 Mのトリス-HCl、5 mMの2-メルカプトエタノールを含み、NaOHで8.0にpHを調節してある1000 mLの緩衝液8.0 G中に懸濁した。23 °Cでの1時間の攪拌後、この溶菌物を10,000 × gでの30分間の遠心分離により清澄化し、そして上清をWhatman No. 3の濾紙を通して濾過した。予め緩衝液8.0 Gで平衡化してある200 mLの充填容積のNi-ニトリ



ロトリ酢酸 (NTA) - アガロース (Qiagen, Inc. 社) をこの濾液に添加し、濾過により回収し、そして排水した。この溶菌物-樹脂スラリーを 23 °C で 24 時間攪拌し、次いでこの樹脂を Whatman No. 3 の濾紙上での濾過により回収した。排水した樹脂を 500 mL の緩衝液 8.0 G 中に懸濁し、そしてクロマトグラフィーカラム (5 cm 直径) 内に充填した。このカラムを 500 mL の緩衝液 8.0 G で、次いで緩衝液 8.0 G と同一組成であるが、以下の値、すなわち pH 6.3、6.1、5.9、5.7、および 5.5 に NaOH で pH を調節してある各 320 mL の緩衝液で連続的に洗浄した。40 mL の溶出分画を回収した。既述の要領で、免疫アッセイにより DP-1 蛋白質の位置を突き止めた。陽性分画をプールし、そして pH を NaOH で 8.0 に調節した。免疫アッセイおよびウエスタンブロット分析は、DP-1 配列を含む物質の約 50 % がその樹脂に吸着され、そしてプールされた分画内に回収されたことを示した。残りの物質は C-末端オリゴヒスチジン親和性テイルを明らかに欠いており、それは恐らく蛋白質合成の早期停止の結果であると思われる。

2-メルカプトエタノールの濃度を 17 mM に調節し、そしてプールした物質を 23 °C で 5 時間攪拌した。この物質を、緩衝液 8.0 G で予

め再平衡化させてある同じ Ni-NTA-アガロースカラムに再度かけた。その後このカラムを 200 mL の緩衝液 8.0 G および同一組成であるが pH が 6.5 である 400 mL の緩衝液、次いでトリエチルアミンで pH 6.5 に調節してありかつ 5 mM の 2-メルカプトエタノールが添加されている 0.1 M の酢酸からなる 400 mL の緩衝液で洗浄した。DP-1 蛋白質は、トリエチルアミンで pH 5.0 に調節してある 0.1 M の酢酸からなる 800 mL の緩衝液で溶出される一方で、40 mL の溶出分画を回収した。免疫アッセイにより DP-1 蛋白質の位置を突き止めた。陽性分画をプールし、そしてその緩衝液を凍結乾燥により除去した。凍結乾燥化物質の収量は 100 mg であり、これはその物質が取得されてきた 100 g の細胞ペースト中に存在する総蛋白質の約 1 % に相当する。

精製された DP-1 のアミノ酸分析を表 I に示し、そしてこれは予想されるア

ミノ酸配列とは7%を下回る不純度で一致した(大腸菌( E. coli )の総組成を反映するアミノ酸組成の蛋白質として( Scaechter, M. et al., Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Neidhardt, F. C. (ed) Washington D. C., American Association for Microbiology, p. 5 (1987) ) )。

表 I

## F P 3 2 0 3 から回収された 8 量体の D P 1 - A の アミノ酸分析

## 分子当たりの残基数

アミノ酸	理論値	実験値	モル数 (n) 実験値 (未変性)
Gly	383	367	10.91
Ala	235	[235]	6.98
Glx	92	98	2.91
Leu	40	40	1.32
Ser	37	37	1.09
Tyr	24	25	0.75
Arg	18	22	0.66
Met	3	3	0.09
His	6	8.7	0.26
Asx	0	6	0.18
Thr	1	4	0.13
Val	0	4	0.13
Ile	0	3	0.10
Phe	0	0	
Lys	0	3	0.10
Pro	0	0	0.00

純度 : 93%

D P - 1 B, 16 (配列番号 82) の精製 :

株 F P 3 3 5 0 を既述の条件下で、5 リットル中で増殖させた。解凍した細胞ペースト (154 g) を 1000 mL の緩衝液 8.0 G 中に懸濁し、そして 23 °C で 2 時間攪拌した。この溶菌物を 10,000 × g で 30 分間の遠心分離によ

り清澄化した。この上清に、緩衝液 8. 0 G で平衡化してある 300 mL (充填容積) の Ni-NTA アガロースを添加した。この混合物を 23℃ で 18 時間攪拌し、その後にこの樹脂を 1, 000 × g で 30 分間の遠心分離により回収した。この樹脂を緩衝液 8. 0 G で 800 mL に希釈し、混合し、そして沈降させた。上清を除去し、そしてこの沈降手順を反復した。沈降した樹脂は、その後に等量の緩衝液 8. 0 G で希釈し、そしてクロマトグラフィーカラム (5 cm 直径) に充填した。このカラムを、(a) 1300 mL の緩衝液 8. 0 G、(b) 8 mM のイミダゾールを含む 500 mL の緩衝液 8. 0 G、(c) 100 mL の緩衝液 8. 0 G、および (d) 500 mL の緩衝液 6. 5 G (緩衝液 8. 0 G と同一組成であるが、pH を NaOH で 6. 5 に調節してある)、で連続的に洗浄した。DP-1B. 16 蛋白質は最終的には緩衝液 5. 5 G (緩衝液 8. 0 G と同一組成であるが、pH を NaOH で 5. 5 に調節してある) で溶出した。DP-1B. 16 を含む分画をスポット免疫アッセイにより同定し、プールし、そして Centriprep 30 遠心分離式濃縮装置 (Amicon 社) を用いる超遠心分離により約 40 倍に濃縮した。蛋白質を 5 倍容のメタノールの添加により沈殿させ、4℃ で 16 時間インキュベートし、遠心分離により回収し、メタノールで 2 度洗浄し、そして吸引乾燥させた。

乾燥物質の収量は 287 mg であり、これはその物質が取得されてきた 154 g の細胞ペースト中に存在する総蛋白質の約 2% に相当する。

アミノ酸分析を表 I I に示し、そしてこれは、試料中の総蛋白質の約 21% の不純度 (大腸菌 (*E. coli*)) の総組成を反映するアミノ酸組成の蛋白質として) で、予想されるアミノ酸配列と一致した。

表 I 1

F P 3 3 5 0 から回収される 8 量体の D P - 1 B. 1 6 のアミノ酸分析

アミノ酸	分子当たりの残基数		モル数 (n) 実験値 (未変性)
	理論値	実験値	
Gly	383	338	26.27
Ala	235	[235]	18.25
Glx	92	105	8.13
Leu	40	54	4.22
Ser	37	32	2.44
Tyr	24	25	1.95
Arg	18	30	2.32
Met	3	4.2	0.32
His	6	24.2	1.88
Asx	0	19.2	1.49
Thr	1	9.4	0.73
Val	0	13.5	1.05
Ile	0	10.7	0.83
Phe	0	7.3	0.57
Lys	0	10.1	0.78
Pro	0	8.6	0.67

純度 : 79%

DP-2A (配列番号 83) の精製 :

株 F P 3 2 7 6 は、増殖用培地に、接種時には 0.375 g/l の L-プロリンが、そして誘導時には 0.1 g/l のグリシンおよび L-アラニン、ならびに 0.0375 g/l の L-プロリンが補足されていることを除いては、既述の条件下で 5 リットル中で増殖させた。2 つのこのような発酵物 (それぞれ 150 g

および140 g)からの解凍させた細胞ペーストを各々1000mLの緩衝液8.0G中に懸濁し、そして23°Cで1時間攪拌した。この溶菌物を10,000×gでの30分間の遠心分離により清澄化した。この上清を合わせ、そして緩衝液8.0Gで平衡化してある300mL(充填容積)のNi-NTAアガロースと混合した。この混合物を23°Cで18時間攪拌し、その後にこの樹脂を1,000×gでの30分間の遠心分離により回収した。この樹脂を緩衝液G8.0で800mLに希釈し、混合し、そして沈降させた。上清を除去し、そしてこの沈降化手順を2度組返した。沈殿した樹脂をその後に等量の緩衝液G8.0で希釈し、そしてクロマトグラフィーカラム(5cm直径)中に充填した。このカラムを、(a)1350mLの緩衝液8.0G、(b)8mMのイミダゾールを含む400mLの緩衝液8.0G、(c)100mLの緩衝液8.0G、および(d)750mLの緩衝液6.5G、で連続的に洗浄した。DP-2A蛋白質は最終的には緩衝液5.5Gで溶出した。DP-1B.16を含む分画をスポット免疫アッセイにより同定し、そしてプールした。

総計240mLのプール分画の内の150mLを取り出し、そしてCentriprep 30遠心分離式濃縮装置(Amicon社)を用いる超遠心分離により約40倍に濃縮した。蛋白質を5倍容のメタノー

ールの添加により沈殿させ、4°Cで16時間インキュベートし、遠心分離により回収し、メタノールで2度洗浄し、そして吸引乾燥させた。乾燥物質の収量は390mgであった。

残りの90mLのプールカラム分画はCentriprep 30遠心分離式濃縮装置を用いて8倍に濃縮し、もともとの容積に水で希釈し、そして再度濃縮した。グアニジンを5mMを下回る濃度にまで除去する目的でこの手順を追加的に3回繰り返した。この物質は最終的に凍結乾燥した。凍結乾燥化物質の重量は160mgであった。従って精製されたDP-2Aの総収量は550mgであり、これはその物質が取得されてきた290gの細胞ペースト中に存在する総蛋白質の約2%に相当する。

凍結乾燥化物質の試料のアミノ酸分析を表IIIに示し、そしてこれは、試料

中の総蛋白質の4%を下回る割合を表す不純度（大腸菌（E. coli）の総組成を反映するアミノ酸組成の蛋白質として）で、予想されるアミノ酸配列と一致した。

表 I I I

株 F P 3 2 7 6 から回収される 8 量体の D P - 2 A のアミノ酸分析

アミノ酸	分子当たりの残基数		モル数 (n) 実験値 (未変性)
	理論値	実験値	
Gly	373	351	16.98
Ala	185	[185]	8.95
Pro	169	158	7.64
Glx	130	93	4.51
Ser	51	48	2.35
Tyr	56	57	2.76
Met	3	2.0	0.10
His	6	9.2	0.45
Leu	1	1.8	0.09
Asx	0	ND	ND
Thr	1	ND	ND
Val	0	5.5	0.27
Ile	0	0	0.00
Phe	0	2.8	0.13
Lys	0	1.9	0.09
Arg	1	0	0.00

純度：96%

本発明は、クモシルク変異体蛋白質の産生に有用な数々の特異的発現系の構築法を開示する。当業者が本発明の原理を使用して具体的には論議されていない無数の他のクモシルク変異体蛋白質を作成することが可能であるだろうという疑いを全く残さない目的で、合成クモシルク変異体DNAを欠損する発現ベクター ( p F P 2 0 4 ) で形質転換される大腸菌 ( E. coli ) 細菌をブダペスト条約の規定によりATCCに寄託してあり、そしてこれはATCC番号ATCC 6 9 3 2 6により同定される。宿主細胞である大腸菌 ( E. coli ) HB 1 0 1内に含まれる発現体p F P 2 0 4は本発明の合成クモシルクDNAをクローン化するのに必要な全ての制限部位を含み、そしてこの発現体を使用していずれかのクモシルク変異体蛋白質を発現させることが可能である。

その上、DP-1 B. 16のコーディング配列 (配列番号82) を保持するプラスミドp F P 6 7 4で形質転換させた発現宿主株大腸菌 ( E. coli ) BL 2 1 (DE3) はブダペスト条約の規定によりATCCに寄託してあり、そしてこれはATCC番号ATCC 6 9 3 2 8により同定される。この株を用いて本発明に従うDP-1 Bを産生するか、あるいは当業者に良く知られる方法によりプラスミドを除去し、そしてp F P 2 0 4から取得される他の発現ベクターで形質転換させることができる。

#### 実施例6

DP-1アナログの合成およびバチルス スプチリス (Bacillus subtilis) 中でのその発現

バチルス スプチリス (Bacillus subtilis) 中での発現のためには、プラスミドp F P 1 4 1からのDP-1アナログコード化遺伝子をB. スプチリス ( B. subtilis ) 中で複製することが可能なプラスミドベクター内に入れた。DP-1のコーディング配列を、レバンスクラゼ ( Lvs ) 遺伝子によりコードされ、分泌シグナル配列を含むN-末端アミノ酸配列がそのN-末端でDP-1配列に融合されるような様式でバチルス アミロリクエファキエンス ( Bacillus amyloliquefaciens ) のレバンスクラゼ ( Lvs ) 遺伝子から取得されるプロモーターに操作的に連結し



た。幾つかの事例では、この種類の遺伝子融合は外来性蛋白質の産生および細胞外培地内へのその分泌を亢進することが示されている (Nag ar a j a n e t a l.、米国特許第 4, 8 0 1, 5 3 7 号)。

図 15 に説明されるように、*B. subtilis* ( B. subtilis ) に適切なベクター内への移入のための DP-1 アナログ遺伝子を調製するためには、プラスミド pFP541 内の DP-1 コーディング配列の近位末端のエンドヌクレアーゼ Bgl II 部位をまず、合成オリゴヌクレオチドの挿入により Eco RV 部位へと変換した。プラスミド pFP541 の DNA をエンドヌクレアーゼ Bgl II で消化した。約 0. 1 p モルの直線化プラスミド DNA をその後に 10 p モルの合成二本鎖オリゴヌクレオチド (S19/10) と共に、以下の配列

5' HO-GATCAGATATCG (配列番号 16)

TCTATAGCCTAG-OH 5' (配列番号 17)

を用いる連結条件下でインキュベートした。

大腸菌 ( E. coli ) HMS174 のアンピリシン耐性形質転換体を合成オリゴヌクレオチド配列により提供される Eco RV 部位を含むプラスミド DNA についてスクリーニングした。 Eco RV 部位を含むプラスミドを同定し、そして pFP169b (図 15) と表示した。次には DP-1 コーディング配列を保持する DNA 断片を pFP169b からエンドヌクレオアーゼ Eco RV および Bam HI で消化ならびにアガロースゲル電気泳動により得られる DNA 断片の分離後に単離した。適切なサイズのバンドを臭化エチウジウム染色化ゲルから切り出し、そして DNA を GENE CLEAN (商標) 方法 (Bio 101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。

プラスミドベクター pBE346 は、大腸菌 ( E. coli ) および *B. subtilis* ( B. subtilis ) の両方内での自律的複製を付与する複製起点、および大腸菌 ( E. coli ) (アンピリシ

ン) および *B. subtilis* (カナマイシン) 内での選択可能な抗生物質耐性マーカーを含む。その上このプラスミドは、黄色ブドウ球菌のプロテインA遺伝子に操作的に連結される lys プロモーターおよび分泌シグナルを含む。プロテインA遺伝子はその近位末端で Eco RV部位により、結合して、その部位を lys シグナル配列から切り離し、かつその遠位末端で Bam HI末端で結合している。pBE346の完全なDNA配列(図14)を配列番号79および図14に示す。プロテインA遺伝子を除去し、そしてDPR-1遺伝子によるその置換を可能にする目的でプラスミドpBE346のDNAをエンドヌクレアーゼ Eco RVおよび Bam HIで消化し、そして適切なサイズの断片をアガロースゲル電気泳動後に単離した。DNAはGENECLON(商標)方法(Bio101, Inc. 社, P. O. Box 2284, La Jolla, CA)により、臭化エチジウム染色化ゲルバンドから回収した。

pFP169b(上述)から精製されたDNA断片をpBE346から精製されたDNA断片と混合し、そして連結条件下でインキュベートした。連結されたDNAを用いて大腸菌(*E. coli*) HNS174を形質転換し、そしてアンピリシン耐性形質転換体を、エンドヌクレアーゼ Eco RVおよび Bam HIでの消化後の適切なサイズの断片の存在についてそのプラスミドDNAを調査することによりスクリーニングした。正しいプラスミドを同定し、そしてpFP191(図15)と表示した。

プラスミドpFP191のDNAを用いて *B. subtilis* BE3010の受容性細胞を形質転換した(trp

lys apr npr sacB)。形質転換体をカナマイシンに対する耐性について選択した。BE3010はNagarajanら、Gene、114、121(1992)により記載される *B. subtilis* BE1500(trpC2、metB10、lys3、delta-apr E、delta-npr、sacB::ernC)から取得され、このBE1500は受容性BE1500細胞を *B. subtilis* 1S53(Bacillus Genetic Stock Center, Oh

io State University)からのDNAで形質転換させ、そしてメチオニン原栄養株について選択することにより取得される。受容性細胞の形質転換は主に、Nagarajanら、米国特許第4,801,537号により記載されるように実施した。

BE3010のカナマイシン耐性形質転換体は、コロニー免疫アッセイによりDP-1を産生する能力についてスクリーニングした。コロニーを、mL当たり5マイクログラムのカナマイシンが添加されているTBABアガーを含むプレート上に置いてある酢酸セルロースディスク上で増殖させた。コロニーを37℃で形成させた後にこの酢酸セルロースディスクを、0.8%のスクロースが添加されている同一培地を含む新しいプレートに移し、そしてそれをそのアガーの表面に置いてあるニトロセルロースディスクの上に被せた。37℃での3時間のインキュベーションの後に、このニトロセルロースディスクを取り出し、そして既述の要領で、過酸化水素が添加されている抗-DP-1血清、パーオキシダーゼ結合化ヤギ抗-ウサギIgG、および4-クロロ-1-ナフトールで染色した。コロニーの陽性染色像が観察され、このことはDP-1

コーディング配列を全く伴わないプラスミドを含む陰性対照株と比較した際のDP-1の産生および分泌を示す。陽性株をFP2193と表示した。FP2193はブダベスト条約の規定によりATCCに寄託しており、そしてこれはATCC番号ATCC69327により同定される。

FP2193によるDP-1の産生および分泌を液体培養物中でアッセイした。株FP2193を、リットル当たり33gのバクト(Bacto)ートリプトン(Difco社)、20gのイーストエキストラクト、7.4gのNaCl、12mLの3N NaOH、0.8gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.4gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2%のカザアミノ酸(Difco社)、0.5%のグリセロール、0.06mMのMnCl<sub>2</sub>、0.5nMのFeCl<sub>3</sub>を含む培地B)、pH7.5、中で増殖させた。37℃での3.5時間の増殖後、DP-1の産生を0.8%までのスクロースの添加により誘導した。37℃での追加的な4時間のインキュベーション後、0.5mLの試料を分析した。細胞を遠心分離により除去した。上清の

上部0.4 mLを取り出し、そして2 mLになるまでフッ化フェニルメタンスルホニル (PMSF) を添加した。残りの上清を取り出し、そして棄却した。細胞ペレットを0.32 mLの50 mM EDTA、pH 8.0中に再懸濁させ、そして2 mMのPMSFが添加されている同一緩衝液中の0.08 mLの10 mg/mLの卵白の添加により溶菌した。37°Cでの60分のインキュベーションの後に0.01 mLの2 M MgCl<sub>2</sub>および0.001 mLの1 mg/mLのデオキシリボヌクレアーゼ I を添加し、そしてインキュベーションを37°Cで5分間継続した。各分画、細胞溶菌物、および上清のアリコート (5マイクロモル) を既述の要領でSDSゲル電気泳動および電気ブロット

により分析した。このブロットを抗-DP-1血清で染色した。幾つかの陽性染色性バンドが上清分画内に観察され、そして細胞溶菌物内には微量の陽性バンドのみが観察されたに過ぎなかった。DP-1をコードするDNA配列を全く含まない宿主株BE3010は陽性染色性バンドを全く産生しなかった。従ってB. subtilis (B. subtilis) 株FP2193はDP-1アナログ蛋白質を産生し、かつそれを細胞外培地中に効率良く分泌することが示された。

#### 実施例7

##### ピキア パストリス (Pichia pastoris) 中のDP-1Bの産生

##### 1. 合成遺伝子DP-1B. 33

DP-1B. 33と表示されるDP-1Bをコードする一連の遺伝子を、DP-1B. 9およびDP-1B. 16と同一の反復性配列の蛋白質をコードするが、ただしピキア パストリス (Pichia pastoris) の高発現化アルコールオキシダーゼ遺伝子において好まれるコドンを優先して使用するよう設計した。

##### a. オリゴヌクレオチド

DP-1B. 33をコードする合成遺伝子を、その配列が図16に示される4本の二本鎖合成オリゴヌクレオチドから組み立てた。これらのオリゴヌクレオチドは5'-OH基がリン酸化されていない一本鎖形態で製造業者 (Midland Certified Reagents, Midland, TX) により提

供された。二本鎖形態へのアニールのためには相補的一本鎖オリゴヌクレオチド  
(各667 pモル)を、0.01Mのトリス-HCl、0.01MのMgCl<sub>2</sub>  
、0.05MのNa

Cl、0.001Mのジチオスレイトールを含む0.2mlの緩衝液、pH7.  
9、中で混合した。この混合物を沸騰水中で1分間加熱し、その後に約3時間に  
わたりゆっくりと23℃にまで冷ました。

これらの4本の二本鎖オリゴヌクレオチドはプラスミドベクターpFP206  
中にそれらを挿入することにより別々にクローン化した。プラスミドpFP20  
6のDNAをエンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl IIで消化し、そ  
してGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社、P. O. B  
ox 2284, La Jolla, CA) により精製した。溶出されたプラス  
ミドDNAの約0.1 pモルに対して二本鎖オリゴヌクレオチド P1、P2、  
P3、もしくはP4の内の一つの10 pモルを添加した。4つのプラスミドーオ  
リゴヌクレオチド混合物を4℃での20時間の連結条件下でインキュベートし、  
その後に連結反応を70℃で2分間のインキュベーションにより停止させた。連  
結化DNAをその後にエンドヌクレアーゼ Hind IIIで消化していずれか  
の残存性親pFP206を直線化した。連結化DNAのアリコートを用いて大腸  
菌 (E. coli) HB101を形質転換し、そしてアンピリシン耐性形質転  
換体を選択した。オリゴヌクレオチド P1、P2、P3、もしくはP4を含む  
クローンは、個々の形質転換体から単離されたプラスミド断片をエンドヌクレ  
アーゼ Bam HIおよび Pst Iでスクリーニングすることにより同定した。  
所望される向きの挿入断片を伴うプラスミドの中で、pFP206の2本の Ba  
m HI - Pst I断片の内の短い方をクローン化オリゴヌクレオチドの長さ  
にまで伸長させた。仮想的クローンからのプラスミドDNAは、エンドヌクレ  
アーゼ Bam HIおよび Bgl IIでの消化および3.

8%のMetaPhorアガロース (FMC社) 内での電気泳動による分析によ  
り更に特徴決定を行って、そのプラスミドが正しい向きにそのオリゴヌクレオチ

ドの単一コピーを獲得していることを確認した。正しいクローンを同定し、そしてそれらのプラスミドを、pFP685 (オリゴヌクレオチドP1、配列番号84、85、および86)、pFP690 (オリゴヌクレオチドP2、配列番号87、88、および89)、pFP701 (オリゴヌクレオチドP3、配列番号90、91、および92)、ならびにpFP693 (オリゴヌクレオチドP4、配列番号93、94、および95) と表示した。4つ全てのクローン化オリゴヌクレオチドの配列をDNA配列決定により確認した。

b. 遺伝子の組み立て

サブ配列P1、P2の組み立てのためには、プラスミドpFP685 (P1、配列番号84、85、および86) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Bam HI で消化し、そしてプラスミドpFP690 (P2、配列番号87、88、および89) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Bgl II で消化した。消化したプラスミドDNAを1.2%のアガロース (低融点、BioRad社、Hercules、CA) ゲル中での電気泳動により分画化した。それらのオリゴヌクレオチド配列を含む臭化エチジウム染色化バンドを相対的サイズにより同定し、それらを切り出し、切り出したバンドを合わせ、そしてDNAを溶かしたアガロースからGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101、Inc. 社、P. O. Box 2284、La Jolla、CA) により回収した。溶出して合わせたDNA断片を連結条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB101

を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想サイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そしてpFP707と表示した。

サブ配列P3、P4の組み立てはサブ配列P1、P2と同一様式であるが、ただしプラスミドpFP701 ( Pst I および Bam HI で消化した) ならびにpFP693 ( Pst I および Bgl II で消化した) で開始させて達成した。P3、P4サブ配列を含むプラスミドを同定し、そしてpFP709と

表示した。

DNA単量体 (P 1, P 2, P 3, P 4) の組み立てのためには、プラスミド pFP707 (P 1, P 2) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Bam HI で消化し、そしてプラスミド pFP709 (P 3, P 4) をエンドヌクレアーゼ Pst I および Bgl II で消化した。消化したプラスミドDNAを1.2%の低融点アガロースゲル中での電気泳動により分画化した。P 1, P 2 および P 3, P 4 配列をそれぞれ含む臭化エチジウム染色化バンドを相対的サイズにより同定し、それらを切り出し、切り出したバンドを合わせ、そしてDNAを溶かしたアガロースからGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。溶出して合わせたDNA断片を連結条件下でインキュベートし、そしてアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB101 を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HI お

よび Bgl II で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想サイズの挿入断片を含むプラスミドを同定し、そしてpFP711と表示した。プラスミドpFP711中のDNA挿入断片は直接的DNA配列決定により確認した。

#### c. 遺伝子の 重合

合成遺伝子は、pFP711内の単量体配列で開始する逐次二倍化により伸長した。いずれかの挿入配列を二倍化するためには、プラスミドDNAのアリコートをエンドヌクレアーゼ Pst I および Bam HI で消化し、そして同一プラスミドの別のアリコートをエンドヌクレアーゼ Pst I および Bgl II で消化した。消化物を低融点アガロース (BioRad社、CA) 上の電気泳動により分画化し、そして挿入断片配列を含む臭化エチジウム染色化断片をそれらの相対的サイズにより同定した。2つの挿入断片含有性断片を電気泳動により精製し、そしてGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収し、この2つの

断片を合わせ、そして連結条件下でインキュベートした。3回目の二倍化では、Bam HI 消化物中の2つの断片が十分に分離されず、そのため溶出されたバンドは両方の断片を含んでいた。この場合、2倍過剰の Bgl II - Pst I 断片を連結化に用いた。連結化DNAのアリコートを使用して大腸菌 (E. coli) HB101を形質転換した。アンピリシン耐性形質転換体を選択した。プラスミドDNAを数々の形質転換体から単離し、エンドヌクレアーゼ Bam HIおよび Bgl IIで消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。予想サイズの挿入断片を含むプラスミドを同定した。

この手順により、一連のDP-1B、16アナログをコードするDNA単量体配列 P1, P2, P3, P4の2、4、8、および16回縦列反復物を含む一連のプラスミドを構築した。これらのプラスミドを、pFP713 (2回反復物)、pFP715 (4回反復物)、pFP717 (8回反復物)、およびpFP719 (16回反復物)、ならびにp723 (16回反復物)とそれぞれ表示した。

## 2. ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) 中でのDP-1 およびDP-2アナログ遺伝子の発現

### a. 増殖およびアッセイ

産生レベルを評価するための培養物の増殖のためには、125mlのパッフル付きエーレンマイヤー (Erlenmeyer) フラスコ中の20mlのBMGY (リットル当たり：硫酸アンモニウムが添加されている13.4gのイースト窒素塩基 (nitrogen base) (Difco社)、10gのイーストエキストラクト、20gのペプトン、0.4mgのビオチン、100mlの1Mリン酸カリウム緩衝液、pH6.0、10mlのグリセロール) に、30℃で2日間増殖させてあったYPDアガープレート (リットル当たり：10のイーストエキストラクト (Difco社)、20gのペプトン、20gのバクト (Bacto) アガー (Difco社)、20gのD-グルコース、を含む) から溶出された細胞を、約0.1の吸光度 ( $A_{600nm}$ ) で接種した。この培養物を  $A_{600nm}$  が約25に達するまで (2日間) 30℃で震盪し、この時点で細胞を遠心分離に



より採取した ( $1500 \times g$  で5分)。上清を棄却し、そして細胞を6 ml の BMMY (グリセロールの代わりにリットル当たり5 ml のメタノールを含むこと以外はBMGYと同様) 中に

再懸濁した。この培養物を  $30^{\circ}\text{C}$  で震盪し、そして培養物の ml 当たり 0.005 ml のメタノールを24時間毎に添加した。試料 (1 ml) を再懸濁直後および各間隔に採取した。マイクロフュージ内での遠心分離 ( $6000 \times g$  で2分) により細胞を即座に回収した。分泌がアッセイされる場合には、上部 0.7 ml の上清を取り出し、そしてドライアイス内で凍結した (「培養上清」分画)。排水した細胞ペレットをドライアイス内で凍結し、そして  $-70^{\circ}\text{C}$  で保存した。

細胞をガラスビーズと共に震盪することにより溶菌した。解凍したペレットを1 ml の冷却破壊用緩衝液 (50 mM のリン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.4$ 、1 mM の EDTA、5% (V/V) のグリセロール、1 mM のフッ化フェニルメタンスルホニル) で洗浄し、そして 0.1 ml の同一緩衝液中に再懸濁した。ガラスビーズ (酸洗浄済み、425~600 ミクロン、Sigma Chemical Co. 社) をそれらのビーズの上にメニスカスのみが観察されるまで添加し、そしてその試験管をボルテックスタイプのミキサー上での4分間を2間隔の混合に供し、その間には氷上で冷却を行った。細胞破壊を顕微鏡調査により確認した。完全破壊後には 0.5 ml の破壊用緩衝液を添加し、そして混合した。破壊片およびビーズをマイクロフュージ内でペレット化し (10分)、そして 0.5 ml の上清 (可溶性細胞抽出物) を除去した。その後に破壊片を追加的各 0.5 ml 分量の破壊用緩衝液で2度抽出し、そして 0.5 ml の上清を最初の抽出物と合わせた (「可溶性細胞抽出物」分画)。その後この破壊片を、1.0 M のリン酸ナトリウム、0.01 M のトリス-HCl、6 M のグアニジン-HCl を1 ml 含む緩衝液 6.5 G、 $\text{pH} 6.5$ 、の各 0.5 ml 分量で3回抽出した。合わせた上清は「不

溶性細胞抽出物」分画を含んでいた。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析のためには、抽出物を試料調製用

緩衝液 (0.0625Mのトリス-HCl、pH6.8、2% w/vのナードデシル硫酸塩、0.0025% w/vのプロモフェノールブルー、10% v/vのグリセロール、2.5% v/vの2-メルカプトエタノール) 中に約1000倍に希釈し、そして沸騰水浴中で5分間インキュベートした。アリコート (5~15  $\mu$ l) を8%のポリアクリルアミドゲル (Novex社) につけ、そして染料先端がゲルの底部から1cmを下回る場所に来るまで電気泳動に供した。蛋白質バンドを、Idea Scientific, Inc. 社により製造される装置を用いて電気泳動的にニトロセルロースのシートに移した。転移用の緩衝液は、3.03gのトリスヒドロキシメチルアミノメタン、14.4gのグリシン、0.1% w/vのSDS、25% v/vのメタノールを含んでいた (リットル当たり)。

ニトロセルロースプロットを以下の要領で免疫化学的に染色した。シート上の蛋白質結合部位を、震盪台上での室温で30分の「プロット (Blotto)」 (トリス-食塩水 (0.1Mのトリス-HCl、pH8.0、0.9% w/vのNaCl) 中の3%の無脂肪乾燥乳、0.05%のTween 20) でのインキュベーションにより遮断した。その後このプロットを、「プロット (Blotto)」中で1:1000に希釈した抗DP-1血清と共に1時間インキュベートし、トリス-食塩水で洗浄し、そして「プロット (Blotto)」中で1:1000に希釈したセイヨウカラシパーオキシダーゼ結合化ヤギ抗ウサギIgG血清 (Kierkegaard and Perry Labora-

tories社、Gaithersburg, MD) と共に1時間インキュベートした。再度トリス-食塩水で洗浄した後には、このプロットを、予め24mlのトリス-食塩水および30  $\mu$ lの30%  $H_2O_2$  が添加されている6mlのメタノール中の18mgの4-クロロ-1-ナフトールの溶液に露出した。

様々な分画内のDP-1抗原の定量化のためには、緩衝液6.5G中の系列希釈物のアリコート (1  $\mu$ l) を様々な濃度の精製化DP-1の8量体 (101アミノ酸残基の8回反復物) の標準溶液と共にニトロセルロース上にスポットした。その後このニトロセルロースシートを既述の要領でウエスタンブロット用に

処理した。各試料中のDP-1抗原の濃度は標準スポットの内の一つの色強度と適合することにより評定した。

#### b. 産生株

##### (1) ベクター

DP-1の産生のためのイースト株を構築するためには、クローン化合成DP-1-コード化DNA配列を、プラスミドpHIL-D4 (Phillips Petroleum Co. 社から取得される) もしくはpPIC9 (Invitrogen Corp. 社から取得される) から得られるプラスミドベクター内に挿入した。pHIL-D4の構造を図17に説明する。このプラスミドは大腸菌 (*E. coli*) 内で作動する複製起点 (しかしイースト内ではそのようなことはない)、ならびに大腸菌 (*E. coli*) 内で選択可能なアンピリシンおよびカナマイシン耐性マーカーを含む。カナマイシン耐性マーカーはイーストにおける抗生物質G418に対する耐性も付与する。このプラスミドは

ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) のAOX1の遺伝子の両端と相同な領域を含む。この上流領域はAOX1プロモーターを含み、このプロモーターからの発現はメタノールにより誘導される。発現予定の配列をAOX1プロモーターの近位に挿入する。下流は、AOX1ポリアダニル化部位および転写停止因子、カナマイシンマーカー、ならびにピキア パストリス (*Pichia pastoris*) のHIS4遺伝子をコードする配列である。pHIL-D4中には翻訳化配列は発現予定の配列から上流には全く提供されていない。ベクターpPIC9 (図18) は、AOX1プロモーターの近位に、サッカロミセス セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) アルファ-交配因子遺伝子のシグナル配列および *pro*-配列をコードする配列を含むことを除外してはpHIL-D4に類似する。pPIC9はpHIL-D4のカナマイシン耐性遺伝子も欠いている。

アルファ-交配因子遺伝子の5' 端のすぐ上流に位置するpPIC9内の *Bam* HI部位を除去し、そしてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (Perkin Elmer Cetus社、CA) により天然のAOX1遺伝子に似たもの

へとその配列を回復させた。pPIC9の断片を、以下のプライマー対：

LB1:5'-CAACTAATTATTCGAAACGATGAGATTTC-3' (配列番号98)

LB6:5'-CTGAGGAACAGTCATGTCTAAGG-3' (配列番号99)

および

LB2:5'-GGAAATCTCATCGTTTCGAATAATTAGTTG-3' (配列番号100)

LB5:5'-GAAACGCAAATGGGGAACAACC-3' (配列番号101)

を用いて別々に増幅した。

PCR反応は、Perkin Elmer Cetus社のGene Amp  
キットをAmpli Taq (商標) DNAポリメラーゼと共に用いて、Perk  
in Elmer Cetus社のDNA Thermal Cyclar内で  
実施した。製造業者により配布される説明事項に従った。鑄型DNAは、エンド  
ヌクレアーゼ Bgl I Iおよび Pvu I Iで消化し、そしてその後にGEN  
E CLEAN (商標) 方法 (Bio 101, Inc. 社、P. O. Box 22  
84, La Jolla, CA) により回収された約0.2 ngのpPIC9  
DNAであった。このPCRプログラムは、(a) 94℃で1分、(b) 94℃  
で1分、45℃で2分、72℃で1分、からなる4周期分、(c) 94℃で1分  
、60℃で1分、72℃で1分、からなる25周期分 (各周期を10秒延長する  
)、ならびに (d) 72℃で7分、を含む。産物はGENE CLEAN (商標)  
方法 (Bio 101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Joll  
a, CA) により2つの個別のPCR反応から回収し、そしておおよその等モル  
量で混合した。この混合物をプライマーLB5およびLB6を用いる第二回目の  
PCRのための鑄型として用いた。この反応用のためには、PCRプログラムは  
、(a) 94℃で1分、(b) 90℃で1分、60℃で1分、72℃で1分から  
なる25周期分 (各周期を10秒延長する)、ならびに (d) 72℃で7分、を  
含む。このPCR産物をGENE CLEAN (商標) 方法 (Bio 101, In  
c. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収し、  
その後にエンドヌクレアーゼ Nsi I Iおよび Eco R Iで消化し、そして再

びGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla,

CA) により回収した。この断片を1.5%の低融点アガロース (BioRad 社) 中の電気泳動により精製した。DNAは、切り出したゲルバンドからGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。この断片をpPIC9中の類似断片と置換した。この目的のためには、pPIC9をエンドヌクレアーゼ NsiI および EcoRI で消化した。大きい方の断片を1.2%の低融点アガロースゲル中の電気泳動により精製し、そして切り出したゲルバンドからGENECLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。このPCR断片および大きなpPIC9断片を標準条件下で連結させ、そしてこの連結物を使用して大腸菌 (E. coli) HB101を形質転換した。正しいプラスミドを含むアンピシリン耐性形質転換体を、BamHI部位の非存在についてプラスミドDNAをスクリーニングすることにより同定した。正しいプラスミドをpFP734と表示した。影響を受けている領域中のpFP734のDNA配列をDNA配列決定により確認し、それを図19に示す (配列番号97)。

6連続のヒスチジン残基をコードするDNA配列をpHIL-D4中に挿入した。このような配列は以下の配列を用いて合成二本鎖オリゴヌクレオチド (SF47/48) 上に保持させた。

M G S H H H H H H 末端 (配列番号102)

5'-HO-AATTATGGGATCCCATCACCATCACCATCACT (配列番号103)

TACCCTAGGGTAGTGGTAGTGGTAGTGATTAA-OH 5' (配列番号104)

正しい向きでpHIL-D4の EcoRI 部位内に挿入される際に

このオリゴヌクレオチドによりコードされるアミノ酸を、DNA配列の上に一文  
字コードで示す。pHIL-D4のDNAをエンドヌクレアーゼ EcoRI で消

化し、そしてGENECLEAN (商標) 方法 (Bio 101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。この消化 DNA のアリコート (約 0.02 p モル) を、5' 末端がリン酸化されていないオリゴヌクレオチド SF 47/48 (10 p モル) と混合した。4°C で 19 時間の連結条件下でのインキュベーション後、アリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB 101 を形質転換した。形質転換体をアンピリシン耐性について選択し、そして個々の形質転換体のプラスミド DNA をエンドヌクレアーゼ Pvu

II および Bam HI で消化した後に分析した。正しいプラスミドは、所望される向きでの挿入からもたらされるオリゴヌクレオチド配列のプロモーター近位末端の Bam HI 部位の指標である DNA バンドがその消化物内に存在していることにより同定した。このプラスミドを pFP 684 と表示した。オリゴヌクレオチドの正しい挿入を直接的 DNA 配列決定により確認した。

プラスミドベクター pFP 734 は、pFP 734 内の Not I と Eco RI との間の配列を、以下の配列を用いて合成二本鎖オリゴヌクレオチド (SF 55/56) と置換することにより類似様式で構築した。

FGS QGA 末端 (配列番号 105)

5' HO-AATTCGGATCCCAGGCTGCTTAA (配列番号 106)

GCCTAGGGTCCCACGAATTCGG-OH 5' (配列番号 107)

pFP 734 の DNA をエンドヌクレアーゼ Not I および Eco

RI で消化し、その後に GENECLEAN (商標) 方法 (Bio 101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収した。オリゴヌクレオチド SF 55/56 を先に記載の要領で連結により挿入した。正しいプラスミドを、エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II でのプラスミド DNA の消化の際の新規の断片の存在により同定し、そして pFP 743 と表示した。正しいオリゴヌクレオチド挿入を直接的 DNA 配列決定により確認した。

(2) DP-1B. 33株

次に、DP-1Bをコードする配列を、AOX1プロモーターとHis6オリゴマーをコードする配列との間に位置する各々の非反復 Bam HI 部位で pFP684 および pFP743 内に挿入した。プラスミド pFP717 (101 aa DP-1B の 8 回反復物をコードする) および pFP719 (101 aa DP-1B の 16 回反復物をコードする) の DNA (約 2 マイクログラム) を エンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II で消化した。これらの消化物を低融点アガロース内での電気泳動により分画化し、そして DP-1B をコードする配列を保持する臭化エチジウム染色化バンドをサイズにより同定し、そして切り出した。切り出されたゲルバンドを溶解し、そしてこれらの各々に対してエンドヌクレアーゼ Bam HI で予め消化してある pFP684 もしくは pFP743 の DNA のアリコートを追加した。DNA を GENE CLEAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社、P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収し、そして 13°C で 3 時間の連結条件下でインキュベートした。連結化 DNA のアリコートを用いて大腸菌 (E. coli) HB101 を形質転換し、

そして形質転換体をアンピリシンに対する耐性について選択した。

個々の形質転換体をエンドヌクレアーゼ Bam HI および Bgl II でプラスミド DNA を消化することによりスクリーニングした。正しいプラスミドを、DP-1B、33 遺伝子を含む予想サイズの断片の存在により同定した。ベクター pFP684 から取得されるプラスミドを pFP728 (101 アミノ酸 DP-1B の 8 回反復物をコードする) および pFP732 (101 アミノ酸 DP-1B の 16 回反復物をコードする) と表示した。ベクター pFP743 から取得されるものを pFP748 (101 アミノ酸 DP-1B の 8 回反復物をコードする) および pFP752 (101 アミノ酸 DP-1B の 16 回反復物をコードする) と表示した。

これらのプラスミドの各々を用いて DP-1B 遺伝子を、主に Cregg ら (Mol. Cell. Biol. 5、3376-3385 (1985)) に従ってスフェロプラスト形質転換によりピキア パストリス (Picha pasto

ris) 株GS115 (his4) に転移させた。このピキア (Pichia) 株を500mlのバッフル付きフラスコ内の200mlのYDP培地中、30℃で、0.3~0.4のA<sub>600nm</sub> になるまで増殖させた。細胞を室温で5分間の1500×gの遠心分離により採取し、その後に20mlの滅菌水、次いで20mlの新鮮なSED (1Mのソルビトール、25mMのEDTA、pH8.0、50mMのDTT)、および20mlの1Mソルビトールで洗浄した。細胞を20mlのSCE (1Mのソルビトール、1mMのEDTA、10mMのクエン酸ナトリウム、pH5.8) 中に再懸濁させ、そしてチモリアーゼ (アルスロバクテ ル ルテウス (Arthrobacter

luteus) (ICN Corp. 社; 比活性100,000u/g) から3mg/mlのイースト溶菌酵素 (Yeast Lytic Enzyme) を含む15mlの保存溶液) を添加した。スフェロプラスト化は、0.2mlのアリコートで0.8mlの5% SDS中に希釈し、そしてそしてA<sub>600nm</sub> を測定することによりモニターした。消化は、70~80%のスフェロプラスト化が獲得されるまで継続した。その後にスフェロプラストを室温で10分間の750×gの遠心分離により採取し、10mlの1Mソルビトールで1回、そして10mlのCAS (1Mのソルビトール、10mMのトリス-HCl、pH7.5、10mMのCaCl<sub>2</sub>) で1回洗浄し、そして最終的には0.6mlのCAS内に再懸濁した。0.1mlのスフェロプラスト懸濁液に、プラスミドDNAをエンドヌクレアーゼ Bgl IIで消化し、そしてそれらの断片をGENECLAN (商標) 方法 (Bio101, Inc. 社, P. O. Box 2284, La Jolla, CA) により回収することにより調製されるCAS中の1~5マクログラムの直線状DNA断片を添加した。PEG溶液 (10mMのトリス-HCl、pH7.5、10mMのCaCl<sub>2</sub> 中の20% w/v PEG3350 (Fisher Scientific Co. 社) を含む1ml) を添加し、緩和に混合し、そして室温で10分間インキュベートした。スフェロプラストを先の要領で遠心分離により回収した。排水したペレットを0.15mlのSO S (1Mのソルビトール、0.3 vol/volの培地YPD、10mMのC



a C I 2) 中に再懸濁し、室温で20分間インキュベートし、そして0.85 mlの1Mソルビトールで希釈した。洗浄したスフェロプラストを15 mlのRDアガロース (リットル当たり

: 186 gのソルビトール、10 gのアガロース、20 gのD-グルコール、13.4 gのアミノ酸非含有性イースト窒素源 (D i f c o社)、0.4 mgのビオチン、各50 mgのL-グルタミン酸、L-メチオニン、L-リシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、ならびに20 mlの50×H i sアッセイ培地、を含む) と混合した。50×H i sアッセイ培地の組成は以下に示すとうりであり (リットル当たり)、すなわち50 gのD-グルコース、40 gの酢酸ナトリウム、6 gの塩化アンモニウム、0.4 gのD, L-アラニン、0.48 gのL-アルギニン-HCl、0.8 gのL-アスパラギン-水和物、0.2 gのL-アスパラギン酸、0.6 gのL-グルタミン酸、0.2 gのグリシン、0.2 gのD, L-フェニルアラニン、0.2 gのL-プロリン、0.1 gのD, L-セリン、0.4 gのD, L-スレオニン、0.5 gのD, L-バリン、20 mgの硫酸アデニン、20 mgの塩酸グアニン、20 mgのウラシル、20 mgのキサンチン、1 mgのチアミン-HCl、0.6 mgのピリドキシン-HCl、0.6 mgのピリドキサミン-HCl、0.6 mgのピリドキサル-HCl、1 mgのCaパントテン酸塩、2 mgのリボフラビン、2 mgのニコチン酸、0.2 mgのパラアミノ安息香酸、0.002 mgのビオチン、0.002 mgの葉酸、12 mgのリン酸一カリウム、12 gのリン酸二カリウム、4 gの硫酸マグネシウム、20 mgの硫酸第一鉄、4 mgの硫酸マンガン、20 mgの塩化ナトリウム、100 mgのL-シスチン、80 mgのD, L-トリプトファン、200 mgのL-チロシン、である。RDアガロース中のスフェロプラスト (5 mlのアリコート) を、RDと同一組成であるが、ただしアガロースの代わりにリットル当たり20 gのアガー (D i f c

o社) を用いるRDBプレート上でプレート培養した。プレートを30℃で3~4日間インキュベートした。ヒスチジン原栄養性形質転換体を拾い出し、そして

15 gのアガー、13.4 gのアミノ酸非含有性イースト窒素源、0.4 mgのビオチン、10 mlのグリセロールを含む（リットル当たり）MGYプレートにパッチした。レプリカをMGYアガーの表面上の酢酸セルロースシート上にパッチした。30℃で2日間増殖させた後に、この酢酸セルロースを第二プレートに移したが、この第二プレート上には、グリセロールの代わりに0.5% v/vのメタノールを除いてはMGYと同一組成を有するMMアガーの表面上にニトロセルロースシートが置かれている。30℃での1～3日間のインキュベーションの後にはこのニトロセルロースシートを酢酸セルロースの下から取り出し、「ブロット (Blotting)」で遮断し、そして先に記載の要領で抗-DP-1血清を用いる免疫学的染色により発色させた。このコロニー免疫アッセイにおける青色により同定される陽性形質転換体をMGYマスタープレートから取り出した。形質転換体はMMアガー上での増殖についてもテストした。免疫アッセイ陽性株により産生されたDP-1蛋白質を、先に記載の要領でウエスタンブロット分析によりアッセイした。幾つかのものは、抗-DP-1血清により検出される予想サイズの全長蛋白質を産生することが示された。

## (2) DP-1B産生

2つのこのような形質転換体によるDP-1B産生は図20および21に説明される。図20は、プラスミドpFP728でピキア パストリス (Pichia pastoris) GS115を形質転換することにより取得される株YFP5028による様々な時間のメタノール

誘導後の細胞内産生を示す。この株はウエスタンブロット分析により示されるように、101-アミノ酸残基単量体の各々8、11、13、15回、および20を上回る回数の反復物からなる5つの様々なサイズのDP-1B種を産生する。この株は、恐らくはpFP728由来の挿入断片の多重コピーの存在を示すと思われる0.5 mg/mlの抗生物質G418を含むYPD培地上で増殖する能力によりピキア (Pichia) 形質転換体の内で同定された。DP-1Bの総産生はリットル培養物当たり1 gを上回っていた。図21は、プラスミドpFP748でのピキア パストリス (Pichia pastoris) GS115の

形質転換により取得される株 YFP5093 による DP-1B の細胞内および細胞外産生を示す。産生される DP-1B の有意な分画は細胞外培養物上清から回収された。

#### 実施例 8

##### クモしおり系蛋白質に対する組換え合成アナログからの線維の溶液化および押し出し加工の説明

線維紡績のためには、DP-1B をイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。大腸菌 ( *E. coli* ) FP3350 の凍結細胞ペーストを解凍し、0.02M のトリス-HCl 緩衝液、pH 8.0 (緩衝液 A) 中に懸濁し、そして Mantin-Gaulin ホモジナイザーを通す段階 (3~4 回) により溶菌した。細胞破壊片を遠心分離により除去し、そして可溶性抽出物を 15 分間 60℃ に加熱した。不溶性物質を再度遠心分離により除去し、そして可溶性の加熱処理抽出物を pH 8.0 に調節し、そして 0.025M を下回る導電率にまで希釈し、そして緩衝液 A で平衡化してある SP-セファロースファストフロー (S

epharose Fast Flow) (Pharmacia 社、Piscataway, NJ) のカラムにかけた。そのカラムを緩衝液 A で洗浄し、そして緩衝液 A 中の 0~0.5M の NaCl の直線濃度勾配液で溶出した。DP-1B 含有性分画を先に既述の要領でゲル電気泳動および免疫プロット形成により同定し、プールし、そして DP-1B を 0℃ における 4 倍容のメタノールでの沈降および遠心分離により回収した。ペレットをメタノールで 3 回洗浄し、そして吸引乾燥した。この物質はアミノ酸分析により決定した所、95% を上回る純度の DP-1B であることが判明した。

簡潔に述べると、精製化 DP-1 蛋白質から有用な線維を産生させる方法は、HFIP 中の溶解の段階、およびその後の線維を取得するための紡績口金開口部を通すその溶液の紡績の段階を必要とする。引張強さ、伸び率、および初期モジュールのような物理学的特性を、テスト標本の長さが 1 インチであることを除いては ASTM Standard D 2101-82 に従う方法および装置を使用して測定した。各テストにつき、試料当たり 5 つの切れ目を作成した。

H F I P 溶液からのシルク線維の湿式紡績

D P - 1 をポリエチレン製注射器内のヘキサフルオロイソプロパノール (H F I P) に添加して H F I P 中の D P - 1 の 20% 溶液を作成した。この溶液を 2 本の注射器の間を押し出しにより往復させることにより完全に混合し、そして一晩放置した。

H F I P 中の D P - 1 の 20% の固溶体を焼結ステンレス鋼製 D Y N A L L O G (商標) フィルター (X 7) をはめ込んである注射器に移した。この注射器にキャップをはめ、そして周期的に排気を行ってこの溶

液中に捕獲されていた空気泡を発散させた。その後に注射器用ポンプを用いて溶液をフィルターに通し、そしてステンレス鋼製の紡績金具中の 5 m i l 直径で 4 m i l 長さの開口部を通してその溶体を注射器から押し出し、3.5 インチのエアギャップを通して 20°C のイソプロパノールの容器内に導入した。溶液が 8.3 f p m でイソプロパノール中に押し出される際に形成されるフィラメントを 11 f p m でボビンに巻き付けた。

紡績されたフィラメントをイソプロパノール中で一晩放置した。その後にこのフィラメントを、まだ湿っている内に 150°C のチューブ型燃焼室内で 2 x の長さに引き伸ばした。伸ばした線維をその後に室内で空気乾燥させた。

乾燥線維の試料の物理学的テストは、それらが 16.7 デニールであり、1.22 g p d の引張強さ、103.3% の伸び率、および 40.1 g p d の初期モジュールを有することを示した。これらの所見は、紡績した D P - 1 スパイダーシルク変異体線維の引張強さおよびモジュールは市販の織物用線維のものに都合良く匹敵し、そしてそのため有用な線維であると見なすことができることを示す。

配 列 表

## (1) 一般情報:

## (i) 出願者:

(A) 氏名: E. I. DU PONT DE NEMOURS A  
ND COMPANY

(B) 街路名: 1007 MARKET STREET

(C) 市: WILMINGTON

(D) 州: DELAWARE

(E) 国: アメリカ合衆国 (UNITED STATE OF A  
MERICA)

(F) 郵便コード (ZIP): 19898

(G) 電話番号: 302-992-4929

(H) テレファックス: 302-773-0164

(I) テレックス: 6717325

(ii) 発明の名称: 新規の組換え産生性クモシルクアナログ

(iii) 配列の数: 107

(iv) コンピューター解読可能形態:

(A) 媒質の種類: フロッピーディスク

(B) コンピューター: MACHINTOSH

(C) 操作システム: MACINTOSH 6.0

(D) ソフトウェア: MICROSOFT WORD 4.0

(v) 現在の出願データ:

(A) 出願番号:

( v i ) 既存の出願データ :

( A ) 出願番号 : 08 / 077, 600

( B ) 出願日 : 1993年6月15日

( 2 ) 配列番号 1

( i ) 配列の特徴

( A ) 配列の長さ : 34

( B ) 配列の種類 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未決定

( D ) トポロジー : 未決定

( i i ) 配列の種類 : ペプチド

( x i ) 配列

Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Xaa	Gln	Gly	Ala	Gly	Arg
1			5					10					15		
Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
		20					25						30		
Gly	Gly														

( 2 ) 配列番号 2

( i ) 配列の特徴

( A ) 配列の長さ : 15

( B ) 配列の種類 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 未決定

( D ) トポロジー : 未決定

( i i ) 配列の種類 : ペプチド

( x i ) 配列

Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

## (2) 配列番号3

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 5

(B) 配列の種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未決定

(D) トポロジー: 未決定

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列

Gly Pro Gly Gly Tyr  
 1 5

## (2) 配列番号4

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 5

(B) 配列の種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未決定

(D) トポロジー: 未決定

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列

Gly Pro Gly Gln Gln  
 1 5

## (2) 配列番号5

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 14

(B) 配列の種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

( i i ) 配列の種類 : ゲノムDNA

( x i ) 配列

ACGACCTCAT CTAT

14

(2) 配列番号6

( i ) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 14

(B) 配列の種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

( i i ) 配列の種類 : ゲノムDNA

( x i ) 配列

CTGCCTCTGT CATC

14

(2) 配列番号7

( i ) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 14

(B) 配列の種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

( i i ) 配列の種類 : ゲノムDNA

( x i ) 配列



AATAGGCGTA TCAC

14

## (2) 配列番号 8

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 19

(B) 配列の種類 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 未決定

(D) トポロジー : 未決定

## (ii) 配列の種類 : ペプチド

## (xi) 配列

Gly	Arg	Gly	Ala	Gly	Gln	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Gln	Gly
1				5				10						15	

Ala Gly Cys

## (2) 配列番号 9

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 19

(B) 配列の種類 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 未決定

(D) トポロジー : 未決定

## (ii) 配列の種類 : ペプチド

## (xi) 配列

Ser	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Tyr	Gly	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly
1				5				10						15	

Pro Gly Cys

## (2) 配列番号 10

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 10

(B) 配列の種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未決定

(D) トポロジー: 未決定

## (ii) 配列の種類: ペプチド

## (xi) 配列

Gly	Ser	His	His	His	His	His	Ser	Arg
1				5				10

## (2) 配列番号 11

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 27

(B) 配列の種類: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: ゲノムDNA

## (xi) 配列

GATCCCATCA CCATCACCAT CACTCTA

27

## (2) 配列番号 12

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 27

(B) 配列の種類: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : ゲノムDNA

(x i) 配列

GATCTAGAGT GATGGTGATG GTGATGG

27

(2) 配列番号 1 3

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 8

(B) 配列の種類 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 未決定

(D) トポロジー : 未決定

(x i) 配列

Gly Ser His His His His His His  
1 5

(2) 配列番号 1 4

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 27

(B) 配列の種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : ゲノムDNA

(x i) 配列

GATCCCATCA CCATCACCAT CACTAAA

27

(2) 配列番号 1 5

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 27

(B) 配列の種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(i i) 配列の種類 : ゲノムDNA

(x i) 配列

GATCTTTAGT GATGGTGATG GTGATGG

27

(2) 配列番号16

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 12

(B) 配列の種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(i i) 配列の種類 : ゲノムDNA

(x i) 配列

GATCAGATAT CG

12

(2) 配列番号17

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 12

(B) 配列の種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(i i) 配列の種類 : ゲノムDNA

(x i) 配列

GATCCGATAT CT

12

(2) 配列番号18

(i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ : 47
- (B) 配列の種類 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 未決定
- (D) トポロジー : 未決定
- (i i) 配列の種類 : ペプチド
- (x i) 配列

Gly	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gly	
1				5				10						15		
Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	
		20					25						30			
Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala		
		35					40					45				

## (2) 配列番号 19

- (i) 配列の特徴
- (A) 配列の長さ : 651
- (B) 配列の種類 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 未決定
- (D) トポロジー : 未決定
- (i i) 配列の種類 : 蛋白質
- (x i) 配列

Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	
1				5					10					15		
Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gly	
		20					25						30			
Gly	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	
		35					40					45				
Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	
		50				55					60					

Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly  
 85 90 95  
 Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala  
 100 105 110  
 Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Asn  
 115 120 125  
 Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
 130 135 140  
 Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 165 170 175  
 Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala  
 180 185 190  
 Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly  
 195 200 205  
 Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
 210 215 220  
 Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Gln Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly  
 245 250 255  
 Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Glu Gly Ala Gly Ala  
 260 265 270  
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu  
 275 280 285  
 Gly Gly Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln  
 290 295 300  
 Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Gln  
 325 330 335  
 Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly  
 340 345 350  
 Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly  
 355 360 365  
 Gln Gly Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln  
 370 375 380

Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Arg Gly  
 405 410 415  
 Tyr Gly Gly Leu Gly Asn Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly  
 420 425 430  
 Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln  
 435 440 445  
 Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Asn Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln  
 450 455 460  
 Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala  
 485 490 495  
 Ala Ala Ala Ala Val Gly Ala Gly Gln Glu Gly Ile Arg Gly Gln Gly  
 500 505 510  
 Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ser Gly Arg  
 515 520 525  
 Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
 530 535 540  
 Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Gln Gly Ala  
 545 550 555 560  
 Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Gln Gly Gly Tyr Gly  
 565 570 575  
 Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala  
 580 585 590  
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu  
 595 600 605  
 Gly Gly Gln Gly Val Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly  
 610 615 620  
 Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Val Gly  
 625 630 635 640  
 Ser Gly Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ala  
 645 650

## (2) 配列番号 20

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 101

(B) 配列の種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未決定

(D) トポロジー: 未決定

## (ii) 配列の種類: 蛋白質

## (xi) 配列

Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala  
 20 25 30  
 Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly  
 50 55 60  
 Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly  
 85 90 95  
 Gly Leu Gly Ser Gln  
 100

## (2) 配列番号 21

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ: 606

(B) 配列の種類: アミノ酸



(C) 鎖の数 : 未決定

(D) トポロジー : 未決定

( i i ) 配列の種類 : 蛋白質

( x i ) 配列

Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala  
 20 25 30  
 Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly  
 50 55 60  
 Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly  
 85 90 95  
 Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala  
 100 105 110  
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu  
 115 120 125  
 Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly  
 130 135 140  
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
 165 170 175  
 Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly  
 180 185 190

C

Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly  
 195 200 205  
 Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly  
 210 215 220  
 Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly  
 245 250 255  
 Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala  
 260 265 270  
 Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly  
 275 280 285  
 Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly  
 290 295 300  
 Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly  
 325 330 335  
 Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 340 345 350  
 Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln  
 355 360 365  
 Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly  
 370 375 380  
 Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly  
 385 390 395 400  
 Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala  
 405 410 415  
 Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly  
 420 425 430  
 Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala  
 435 440 445  
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser  
 450 455 460  
 Gln Gly Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln  
 485 490 495

Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln  
 500 505 510  
 Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly  
 515 520 525  
 Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly  
 530 535 540  
 Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln  
 545 550 555 560  
 Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala  
 565 570 575  
 Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser  
 580 585 590  
 Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln  
 595 600 605

## (2) 配列番号 2 2

## (i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ : 1 0 1

(B) 配列の種類 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 未決定

(D) トポロジー : 未決定

(i i) 配列の種類 : 蛋白質

(x i) 配列

Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 20 25 30  
 Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln  
 35 40 45  
 Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly  
 50 55 60  
 Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala  
 65 70 75 80

Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Ala	Gly	1	5	10	15	
Arg	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	20	25	30		
Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	35	40	45	
Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	50	55	60	
Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Gln	Gly	Ala	65	70	75	80
Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gly	85	90	95	
Gly	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	100	105	110	
Ser	Gln	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	115	120	125	
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	130	135	140	
Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	145	150	155	160

Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg  
 165 170 175  
 Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly  
 180 185 190  
 Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly  
 195 200 205  
 Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly  
 210 215 220  
 Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala  
 245 250 255  
 Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser  
 260 265 270  
 Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala  
 275 280 285  
 Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly  
 290 295 300  
 Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 325 330 335  
 Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly  
 340 345 350  
 Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr  
 355 360 365  
 Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln Gly Ala Gly  
 370 375 380  
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly  
 385 390 395 400  
 Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser  
 405 410 415  
 Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala  
 420 425 430  
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln  
 435 440 445  
 Gly Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala  
 450 455 460